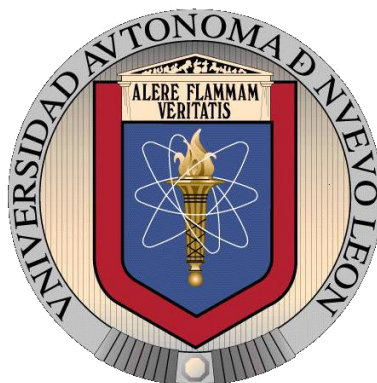


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CATALIZADORES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITES
VEGETALES RESIDUALES

Por:

BIOL. EUGENIA GUADALUPE ORTIZ LECHUGA

Como requisito parcial para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA

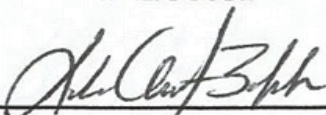
Enero 2016

CATALIZADORES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITES
VEGETALES RESIDUALES



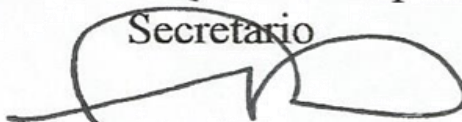
Dra. Katiushka Arévalo Niño

Director



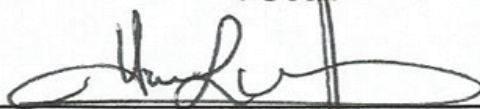
Dra. Isela Quintero Zapata

Secretario



Dr. Luis J. Galán Wong

Vocal

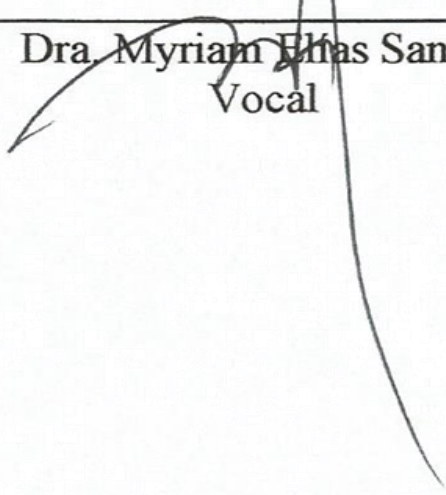


Dr. Hugo A. Luna Olvera

Vocal

Dra. Myriam Elías Santos

Vocal

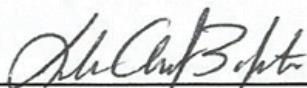


CATALIZADORES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITES
VEGETALES RESIDUALES

Dirección de Tesis



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Director



Dra. Isela Quintero Zapata
Co-Director

Agradecimientos

Estoy profundamente agradecida con todas las personas que directa e indirectamente han sido parte de mi formación académica y personal. Especialmente con la UANL que me abrió sus puertas desde que vine a buscar una oportunidad en este complicado pero bonito camino. **Alere Flammam Veritatis!**

Especialmente quiero agradecer:

A la Dra. Kaitushka Arévalo Niño, quien me dio la oportunidad de seguir trabajando con una línea de investigación que disfruto profundamente. Gracias Dra. por ser una asesora que permite el desarrollo libre. Una persona que le encuentra 25 horas a un día y que te atiende siempre con una sonrisa sin importar lo cansada que esté. Siempre le agradeceré que haya sido mi mentora.

A la Dra. Isela Quintero Zapata, quien me dio un espacio donde trabajar y llevar mis mas de 200 botellitas de plástico. Gracias Dra. por ser siempre amable, por estar disponible y dispuesta a ayudarme en cualquier situación.

Al Dr. Luis J. Galán Wong. Un investigador admirable, quién ha luchado continuamente por el desarrollo de la ciencia en nuestra Universidad. Gracias por sus clases y sus anécdotas y sobre todo, gracias por nuestro Instituto de Biotecnología.

Al Dr. Hugo A. Luna Olvera. Le agradezco mucho por cuestionarme en cada seminario, cada pregunta, cada sugerencia me hizo e hizo a mi trabajo ser mejor.

A la Dra. Myriam Elías Santos. Muchas gracias por siempre darme ánimo y tener una sonrisa que contagia. Gracias por permitirme trabajar en su laboratorio.

Sin olvidar a mis compañeros y amigos del L6, gracias por todos los buenos momentos. Ile, Ricky, Lalo, Mely, Karla, Astrid, Aza, Emmanuel, Angie, Ulises. E igualmente a mis compañeros del L1, Mayra, Julián, Omar, Sassy, Lulú, Héctor, Mauro, Dra. Lucía, aprecio mucho sus palabras, sus consejos y el café ☺.

Finalmente, un agradecimiento especial a CONACYT, número de beca 316125 quienes sin su apoyo no me habría sido posible la conclusión de mis estudios, una de las pocas instituciones en el mundo que realmente invierte en sus becarios y que no exige retribuciones más que la excelencia de sus profesionistas egresados y su contribución al desarrollo de nuestro país.

Dedicatoria

Para las personas más importantes, mis papás.

Sra. Virginia Lechuga Castillo
Sr. Roberto Ortiz Cobos

Gracias por todo. Los quiero siempre.

Para mi familia.

Para mi compañero. Gracias por soportar mis días *psycho*.
Mi Hiram.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Situación energética en México	3
2.1.2 Leyes y Reformas en el sector energético	4
2.2 Bioenergía	6
2.2.1 Biomasa	7
2.3 Biocombustibles	8
2.3.1 Biocombustibles líquidos	9
2.3.2 Biocombustibles de Primera Generación	9
2.3.3 Biocombustibles de Generación 1.5	9
2.3.4 Biocombustibles de Segunda Generación	9
2.3.5 Biocombustibles de Tercera generación	10
2.3.6 Biocombustibles de Cuarta generación	10
2.4 Biodiesel	11
2.4.1 Producción de biodiesel en el mundo	12
2.4.2 Producción de biodiesel en México	13
2.5 Materia prima para obtención de biodiesel	13
2.6 Aceites vegetales	13
2.6.1 Aceite residual	14
2.6.2 Potencial del aceite vegetal residual	15
2.6.3 Beneficios del uso de aceite vegetal residual	16
2.7 Transesterificación	17
2.7.1 Condiciones de operación para transesterificación	18
2.7.2 Catalizadores	19
2.7.3 Catalizadores alcalinos	19
2.7.4 Catalizadores ácidos	20
2.8 Alcohol y relación molar	21
2.9 Temperatura de reacción	22
2.10 Tiempo de reacción	22
2.11 Transesterificación enzimática	23
2.11.1 Presencia de agua	24
2.11.2 Intensidad del mezclado	25
2.11.3 Beneficios de la transesterificación enzimática	25
2.12 Catalizadores biológicos	25
2.12.1 Uso de las lipasas como biocatalizadores	26
2.12.2 Lipasas extracelulares	27
2.12.3 Lipasas intracelulares	28
2.12.4 Fuentes de obtención de lipasas	28
2.13 Detección de actividad enzimática	30
2.14 Inmovilización enzimática	31
2.14.1 Tipos de inmovilización	32
2.14.2 Adsorción	33
2.14.3 Atrapamiento y/o encapsulación	34
2.14.4 Inmovilización por enlace covalente	34
3. Justificación	36
4. Hipótesis	37
5. Objetivo General	38
5.1 Objetivos particulares	38
6. Materiales y métodos	39

6.1 Obtención de muestras de aceite.....	39
6.2 Filtración.....	39
6.3 Remoción de agua.....	39
6.4 Determinación de ácidos grasos libres expresado en % de ácido oleico y Nivel de acidez (titulación) ¹	40
6.5 Determinación de perfil de ácidos grasos.....	40
6.6 Determinación de peso molecular de aceite.....	41
6.7 Transesterificación química.....	41
6.7.1 Determinación de relación molar alcohol:aceite.....	41
6.7.2 Ajuste de catalizador en base a % de ácidos grasos libres.....	42
6.7.3 Cantidad de catalizador necesario con respecto al peso del aceite.....	42
6.7.4 Cantidad de aceite.....	42
6.7.5 Preparación de metóxido.....	42
6.7.6 Recuperación de biodiesel.....	43
6.7.7 Pre tratamiento ácido.....	43
6.7.8 Lavado de biodiesel.....	43
6.8 Diseño Experimental.....	44
6.9 Pruebas de calidad.....	45
6.10 Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier.....	46
6.11 Selección de sitio y toma de muestras.....	46
6.12 Obtención de microorganismos de muestras de suelo.....	47
6.13 Evaluación cualitativa y semi-cuantitativa de actividad lipolítica para selección de cepas.....	48
6.14 Análisis preliminar para cuantificación enzimática.....	49
6.15 Obtención del paquete celular y sobrenadante.....	49
6.15.1 Liofilización de sobrenadantes.....	49
6.15.2 Secado de paquete celular.....	50
6.16 Curva estándar nitrofenol.....	50
6.17 Ensayo para cuantificación de actividad lipolítica.....	50
6.17.1 Ajuste de pH.....	51
6.18 Selección de biocatalizador.....	51
6.18.1 Extracción de DNA.....	51
6.18.2 Identificación molecular.....	52
6.19 Inmovilización de extracto enzimático crudo.....	52
6.20 Transesterificación enzimática.....	52
6.21 Equipo utilizado.....	53
6.22 Análisis estadístico.....	53
7. Resultados y discusión.....	54
7.1 Obtención de muestras de AVR.....	54
7.2 Determinación de porcentaje de ácidos grasos libres.....	55
7.3 Neutralización de AGL.....	56
7.4 Transesterificación alcalina.....	57
7.5 Pre- tratamiento ácido.....	61
7.6 Rendimiento de producción de biodiesel.....	63
7.7 Optimización de parámetros para producción de biodiesel.....	69
7.7.1 Transesterificación química.....	69
7.7.2 Temperatura y tiempo de reacción.....	69
7.7.3 Concentración de catalizador.....	69
7.7.4 Relación molar.....	72
7.8 Lavado de biodiesel.....	74

7.9 Determinación de biodiesel por FT-IR.....	77
7.10 Determinación de parámetros de calidad.....	78
7.10.1 Color y apariencia.....	78
7.10.2 Conversión mediante prueba 27/3.....	79
7.10.3 Determinación de pH y densidad.....	79
7.10.4 Viscosidad.....	80
7.10.5 Acidez total.....	80
7.10.6 Punto de nube y punto de vertido.....	81
7.10.7 Punto de chispa y punto de ignición.....	81
7.11 Obtención de microorganismos de muestras de suelos.....	84
7.12 Evaluación cualitativa y semi-cuantitativa de actividad lipolítica para selección de cepas.....	84
7.13 Ensayo para cuantificación de actividad lipolítica.....	88
7.13.1 Análisis preliminar.....	88
7.14 Ajuste de pH.....	89
7.15 Liofilización de extractos crudos.....	92
7.16 Actividad intracelular.....	94
7.17 Selección de biocatalizador.....	95
7.18 Identificación molecular.....	95
7.19 Inmovilización de extracto enzimático crudo.....	97
7.20 Transesterificación enzimática.....	99
8. Conclusiones.....	103
9. Perspectivas.....	104
10. Literatura citada.....	105
11. Resumen biográfico.....	137

Índice de tablas

Tabla 1. Rendimiento de cultivos oleaginosos por hectárea aptos para biodiesel.....	14
Tabla 2. Diseño experimental.....	44
Tabla 3. Pruebas de calidad	45
Tabla 4. Perfil de ácidos grasos y peso molecular.	54
Tabla 5. Acidez en muestras de aceite vegetal residual	55
Tabla 6. Valores habituales de acidez libre de las materias grasas.....	55
Tabla 7. Condiciones de reacción E1-NaOH	57
Tabla 8. Condiciones de reacción E1-KOH	58
Tabla 9. Condiciones de reacción E2-NAOH	59
Tabla 10. Condiciones de reacción E2-KOH	60
Tabla 11. Porcentaje de saturación de muestras de aceite.....	61
Tabla 12. Acidez Empresa tres (E3)	62
Tabla 13. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E1-NaOH.....	64
Tabla 14. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E1-KOH	65
Tabla 15. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E2-NaOH.....	66
Tabla 16. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E2-KOH	67
Tabla 17. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E3-KOH	68
Tabla 18. Variables óptimas de producción de biodiesel.....	69
Tabla 19. Parámetros de calidad B100. a) Primera determinación, b) Segunda determinación a los 4 meses de almacenamiento, c) Tercera determinación a los 12 meses de almacenamiento.	82
Tabla 20. Parámetros de calidad B20. a) Primera determinación, b) Segunda determinación a los 4 meses de almacenamiento, c) Tercera determinación a los 12 meses de almacenamiento	83
Tabla 21. Obtención de cepas de acuerdo a la fuente de aislamiento.....	84
Tabla 22. Determinación cualitativa de cepas positivas para lipasas.....	85
Tabla 23. Intensidad de Fluorescencia de cepas bacterianas con actividad lipolítica.....	86
Tabla 24. Diámetro de halo para cepas bacterianas con actividad lipolítica.....	87
Tabla 25. Diámetro de halo para cepas bacterianas con actividad lipolítica.....	87

Índice de figuras

Fig. 1 Fuentes de energía primaria en México	3
Fig. 2 Potencial para cultivos bioenergéticos.....	4
Fig. 3 Ciclo de aprovechamiento de la energía solar y su transformación en biocombustible.....	7
Fig. 4 a) Ejemplar de higuera (<i>Ricinus communis</i>). b) Semillas de higuera.....	7
Fig. 5 Ciclo de producción y uso de biodiesel	11
Fig. 6 Tendencia de producción de biocombustibles	12
Fig. 7 Fuentes de obtención de aceite	16
Fig. 8 Ecuación general de transesterificación... ..	17
Fig. 9 Reacción de transesterificación	18
Fig. 10 Esquema de acción del catalizador enzimático	24
Fig. 11 Inmovilización por adsorción.....	33
Fig. 12 Inmovilización por atrapamiento.....	34
Fig. 13. Inmovilización por enlaces covalentes	35
Fig. 14. Muestras obtenidas de empresas restauranteras	39
Fig. 15 Impurezas retiradas de muestras de aceites.....	39
Fig. 16 Determinación de acidez en aceites	40
Fig. 17 Muestra de biodiesel. a) Biodiesel, b) Glicerol.	43
Fig. 18 a) Bomba de aire, b) manguera y piedra de aireación	44
Fig. 19 Muestras de suelo.	46
Fig. 20 Cultivos en líquido con a) aceite vegetal como inductor.....	47
Fig. 21 Caja con Agar Rodamina B.....	48
Fig. 22 Producción de biodiesel E1 NaOH.....	57
Fig. 23 Producción de biodiesel E1-KOH.....	58
Fig. 24 Producción de biodiesel E2 NaOH.....	59
Fig. 25 Producción de Biodiesel E2-KOH.....	60
Fig. 26 Reacciones saponificadas.....	60
Fig. 27 Esterificación de ácidos grasos.....	62
Fig. 28 Producción de biodiesel E3-KOH.....	63
Fig. 29 Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E1-NAOH..	64
Fig. 30 Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E1-KOH....	65
Fig. 31 Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E2-NaOH...	66
Fig. 32 Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E2-KOH....	67
Fig. 33 Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E3-KOH....	68
Fig. 34 a) Ácido graso saturado; b) Ácido graso insaturado.....	71
Fig. 35 Rendimiento de biodiesel en relación a la concentración de catalizador.....	72
Fig. 36 Relaciones molares óptimas para producción de biodiesel a partir de aceite vegetal residual.....	73
Fig. 37 Porcentaje de pérdida de muestra con la técnica de lavado por agitación....	74
Fig. 38 Porcentaje de pérdida de muestra con la técnica de lavado por agitación....	75
Fig. 39 a) Muestras lavados por burbujeo, b) Piedra de aireación en muestra de biodiesel, c) burbujas a través de la muestra de biodiesel.....	75
Fig. 40 Apariencia de las muestras de biodiesel posteriores al lavado por agitación. a) E1, b) E2, c) E3.....	76
Fig. 41 Espectro de infrarrojo mostrado las regiones características de formación de biodiesel.....	77

Fig. 42 Color y apariencia de las muestras de biodiesel (1= E1, 2= E2, 3=E3). a) Primera determinación de parámetros de calidad. b) Determinación final de parámetros de calidad a los 12 meses de almacenamiento.....	78
Fig. 43 a) Prueba negativa con signos de aceite sin convertir en biodiesel. b) Prueba positiva presentando una sola fase sin impurezas. c) Muestras de biodiesel positivas.....	79
Fig. 44 Determinación de densidad por método de hidrómetro.....	79
Fig. 45 a) Muestras de biodiesel con formación de cristales. b) Muestra de biodiesel en estado sólido.....	80
Fig. 46 Muestra de biodiesel llegando al punto de ignición.....	81
Fig. 47 Ejemplo de cepas de hongos aisladas.....	84
Fig. 48 Ejemplo de cepas de bacterias aisladas.....	84
Fig. 49 Cepa control con actividad lipolítica.....	85
Fig. 50 Ejemplos de cepas con actividad lipolítica.....	85
Fig. 51 Criterio para determinación de intensidad de fluorescencia. a) Intensidad 1 o baja, b) Intensidad 2 o intermedia, c) intensidad 3 o alta.....	86
Fig. 52 Siembra de sobrenadante bacteriano en placa de Agar rodamina B.....	87
Fig. 53 Curva estándar de p-nitrofenol.....	88
Fig. 54 Resultados de cepa control.....	88
Fig. 55 Producción enzimática a diferentes pH. a) Cepa 12, b) Cepa 35, c) Cepa 38.....	90
Fig. 56 Producción enzimática a diferentes pH. a) Cepa 11, b) Cepa 18, c) Cepa 24.....	91
Fig. 57 Comparación de actividad lipolítica bacteriana de extracto crudo vs. Liofilizado.....	92
Fig. 58 Comparación de actividad lipolítica fúngica de extracto crudo vs. Liofilizado.....	93
Fig. 59 Actividad intracelular. a) Cepas bacterianas, b) Cepas fúngicas.....	94
Fig. 60 Resumen de actividades lipolíticas.....	95
Fig. 61 Cepa 12.....	95
Fig. 62 Árbol filogenético para la cepa 12.....	96
Fig. 63 Perlitas de alginato. a) Sin sobrenadante, b) Con sobrenadante.....	97
Fig. 64 Almacenamiento de actividad lipolítica.....	97
Fig. 65 Temperatura óptima.....	98
Fig. 66 Estabilidad térmica.....	98
Fig. 67 Muestra de aceite sin reaccionar.....	100
Fig. 68 Muestra de biodiesel-agua.....	100
Fig. 69 Muestra de biodiesel-aceite.....	100
Fig. 70 FTIR Muestras de biodiesel obtenidas por transesterificación enzimática.....	101

Lista de símbolos y abreviaturas

AVR	Aceite vegetal residual
RPM	Revoluciones por minuto
B20	Biodiesel al 20%
B50	Biodiesel al 50%
AGL	Ácidos grasos libres
PM	Peso molecular
E1	Empresa 1
E2	Empresa 2
E3	Empresa 3
BI	Biodiesel inicial
BF	Biodiesel final
E1-KOH (KOH).	Empresa 1, reacciones catalizadas con hidróxido de potasio
E1-NaOH (NaOH)	Empresa 1, reacciones catalizadas con hidróxido de sodio
E2-KOH (KOH)	Empresa 2, reacciones catalizadas con hidróxido de potasio
E2-NaOH (NaOH)	Empresa 2, reacciones catalizadas con hidróxido de sodio
E3-KOH (KOH)	Empresa 3, reacciones catalizadas con hidróxido de potasio
E3-NaOH (NaOH)	Empresa 3, reacciones catalizadas con hidróxido de sodio
AD	Aislamiento Directo
AO	Aceite de Oliva
AC	Aceite de Canola
AR	Aceite Residual

Resumen

Biocombustible es el nombre que se le da a los carburantes que se obtienen a partir de biomasa de origen agrícola que son susceptibles de ser empleados en motores de combustión interna y que por provenir de una fuente renovable producen un menor impacto ambiental que los combustibles fósiles; siendo los principales el bioetanol, biogás y biodiesel. Para la producción de biodiesel se utiliza un proceso de transesterificación de aceites (vegetales o animales) con un catalizador, tradicionalmente hidróxido de sodio o hidróxido de potasio en presencia de un alcohol de bajo peso molecular. Sin embargo, en la actualidad se encuentran numerosas variantes a esta tecnología, incluyendo el uso de catalizadores biológicos, cuyo objetivo es obtener una reacción más eficiente utilizando materias primas de menor costo como los aceites vegetales residuales, que además son un recurso con potencial de reutilización que está siendo poco aprovechado.

Para la realización de este trabajo se colectaron aceites vegetales residuales de 3 empresas de la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, dichos aceites fueron analizados para obtener su perfil de ácidos grasos, porcentaje de acidez y peso molecular. Se realizó la optimización de producción por medio de transesterificación química obteniendo rendimientos finales de producción de biodiesel de hasta 85.53%. Se evaluó la calidad del combustible y estabilidad de almacenamiento obteniendo resultados dentro de las normas internacionales hasta por 12 meses.

A su vez se obtuvieron muestras de suelo contaminado con aceite vegetal de cual se aislaron 100 cepas de microorganismos de los cuales 38 cepas bacterianas y 14 cepas fúngicas contaron con capacidad de producción de enzimas lipolíticas. Se evaluó la capacidad lipolítica de catalizadores alternativos provenientes de sistemas biológicos mediante células completas de cultivos bacterianos y fúngicos (lipasas intracelulares); sobrenadantes crudos inmovilizados en alginato de sodio al 3% como soporte de biomasa (lipasas extracelulares) y finalmente sobrenadantes liofilizados. Se seleccionó el sobrenadante crudo y se realizó una evaluación en el sobrenadante de termo-tolerancia, reusabilidad, funcionalidad en metanol y finalmente conversión sobre el aceite vegetal residual obteniendo resultados de entre el 15 al 62% de conversión planteando una opción para la obtención de biodiesel.

Abstract

Biofuels is the name given to carburants obtained from biomass of agricultural origin that are used in internal combustion engines, come from a renewable source and produce less environmental impact than fossil fuels, among the main types are bioethanol, biodiesel and biogas. For the production of biodiesel, a conversion process, transesterification, between an oil (plant or animal) a catalyst, traditionally sodium hydroxide or potassium hydroxide in the presence of a low molecular weight alcohol is used. However, currently there are numerous variations to this technology, including the use of biological catalysts, which aims to obtain a more efficient reaction using lower cost raw materials such as waste vegetable oils, which are also a resource with reuse potential that is currently not being exploited to its full potential.

To carry out this work waste vegetable oils were collected from three companies in the metropolitan area of Monterrey, Nuevo Leon; these oils were analyzed for their fatty acid profile, percentage of acidity and molecular weight. Optimization was carried out by chemical transesterification obtaining final yields of biodiesel of 85.53%. Fuel quality and storage stability was evaluated obtaining positive results within international standards for up to 12 months.

In turn, soil samples contaminated with vegetable oil were taken, from which 100 strains of microorganisms were isolated, of which, 38 bacterial strains and 14 fungal strains had production capacity for lipolytic enzymes. The ability of alternative catalysts from biological systems was evaluated using whole cell bacterial and fungal cultures (intracellular lipases); crude supernatants immobilized on 3% sodium alginate as biomass support (extracellular lipases) and finally lyophilized supernatants. An evaluation on the crude supernatant (480 U/L) thermo-tolerance, reusability, functionality in methanol and conversion of waste vegetable oil was performed obtaining results among 15-62% conversion to methyl esters making this a considerable option for the obtainment of biodiesel at a lower production cost.

1. INTRODUCCIÓN

Dada la situación energética que impera en el mundo numerosos países han adoptado políticas de sustentabilidad favoreciendo estrategias como el reciclaje y aprovechamiento de residuos, así como la diversificación energética mediante la búsqueda de nuevas fuentes de energía más amigables al ambiente, dentro de las cuales se encuentran los biocombustibles.

Por definición, los biocombustibles son alcoholes, éteres, ésteres y compuestos orgánicos (Stratta, 2000) producidos a partir de cultivos tanto herbáceos como leñosos, residuos de la agricultura, de la actividad forestal y en menor medida de desechos industriales; siendo los principales el etanol, biogás y biodiesel. Para la producción de bioetanol o etanol de biomasa se utilizan diversos tipos de fermentación; el biogás, se genera en medios naturales o en dispositivos específicos por reacciones de biodegradación de la materia orgánica mediante la acción de microorganismos (Stratta, 2000), mientras que el biodiesel se produce normalmente por medio de transesterificación química o enzimática.

En el caso particular del etanol y biodiesel, su producción proviene en su mayoría de una variedad de cultivos como la caña de azúcar, maíz, betabel, colza, soja y palma de aceite, entre otros; sin embargo, por el destino primario de éstos cultivos, se enfrentan al debate ético acerca de la transformación de cultivos alimenticios para producción de combustibles. Si bien es cierto que el destinar estas materias primas para fines no alimentarios podría tensar aún más el suministro de los mismos y hacer subir los precios de los cultivos haciendo inviable el suministro para ambos fines, se debe considerar la diversificación hacia fuentes alternativas de energía como una opción real y necesaria, proyectando que en un futuro corto las fuentes principales de obtención de biocombustibles provengan no solo de éstos cultivos sino en su mayoría de residuos orgánicos, incluyendo residuos agroindustriales, de material lignocelulósico provenientes de plantaciones forestales energéticas, de cultivos de microalgas y de aceite de cocina (Islas y Jiménez, 2009)

El biodiesel, propuesto originalmente por Rudolf Diesel desde el año 1895 para su prototipo de motor y desplazado por los derivados del petróleo, en la actualidad ha renacido en el interés general ya que es un combustible que cumple con las características que nuestra situación actual requiere; se considera un combustible limpio (García y García, 2006), cuya estructura química está compuesta de esteres de alquilo de ácidos grasos, es biodegradable, no tóxico y esencialmente libre de azufre y compuestos aromáticos. Si bien goza de numerosas ventajas en cuanto a características inherentes del combustible, el mayor obstáculo para su comercialización, es el alto costo de los materiales crudos para su producción (Conneman, 1998; Hass, 2005); sin embargo, estos pueden ser sustituidos por materias primas mas baratas como el aceite vegetal residual (AVR) o aceites no comestibles que permitirían mejorar la viabilidad de su producción a gran escala (Behzadi y Farid, 2007).

El AVR puede provenir de diversas fuentes; domésticas, comerciales e industriales (Refaat, 2010), si bien, la utilización de estos residuos no presenta competencia con los cultivos alimentarios (Hossain y Mazen, 2010), ni es viable para continuar con la función para la cual fue destinado (Refaat, 2010) se consideró como una opción factible para la producción de biodiesel, cumpliendo 3 objetivos principales:

- 1) La posibilidad del desarrollo de un biocombustible que cumple con los estándares de calidad internacionales.
- 2) La eliminación de una fuente de contaminación de agua, considerando su disposición por cañerías (Szmigielski et al. 2008), y a su vez el abaratamiento del tratamiento de las misma.
- 3) La reducción de los costos de producción del biocombustible.

En la realización de este trabajo nos centramos en probar diversas estrategias para la producción de este biocarburante enfocándonos en puntos clave que mejoraran el rendimiento y nos permitirían obtener una reacción más amigable al ambiente, siguiendo dos estrategias; la optimización de parámetros de producción a través del ensayo con variables de importancia y la utilización de enzimas (lipasas) con la finalidad de eliminar el proceso de lavado y obtener un bio-catalizador estable a las condiciones de producción.

2. ANTECEDENTES

2.1 Situación energética en México

Dos de los problemas principales dentro del sector energético en México son:

- A) La creciente dependencia de productos petrolíferos terminados del exterior.
- B) La escasa diversificación de la oferta energética.

Por un lado, existe una demanda creciente de productos energéticos terminados que el país es incapaz de cubrir con su producción nacional, aun cuando existe una situación excedentaria de energía primaria (crudo) teniendo la necesidad de importar energéticos terminados (para uso doméstico, gasolinas, etc.), teniendo como causa principal la falta de inversión para aumentar la capacidad de refinación en el país.

Adicionado a esto, la falta de diversificación de la oferta energética (Fig. 1) es también preocupante con aproximadamente el 90% del consumo de energía primaria correspondiendo a los hidrocarburos y entre ellos el mayor porcentaje corresponde al petróleo crudo (Secretaría de Energía, 2005).

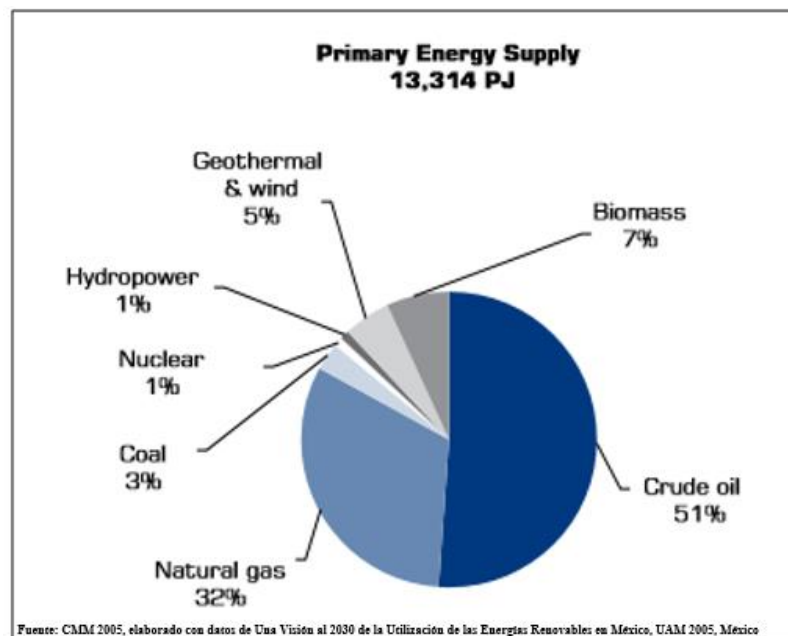


Fig. 1 Fuentes de energía primaria en México

En contraste, las energías renovables tienen un rol marginal, siendo el más representativo el uso de leña para cocción con un 36% de la energía primaria renovable (Alatorre, 2009). Mientras que la biomasa ocupó únicamente un 3.4% de la oferta energética.

Con excepción de la hidroenergía, otras fuentes de energía renovable (Fig. 2) como la geotermia o energía eólica participaron en un pequeño porcentaje en la producción de electricidad primaria.



Fig. 2 Potencial para cultivos bioenergéticos

2.1.2 Leyes y Reformas en el sector energético

A partir del año 2008 la Cámara de Diputados aprobó la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos que estableció las definiciones y políticas para los bioenergéticos en México y que define políticas especiales para promover los biocombustibles teniendo como objetivos; la diversificación de los combustibles en el país, el apoyo al desarrollo sustentable rural y las cadenas de producción, la cooperación con el protocolo de Kioto, el mejoramiento y la calidad del país, la legalización de fuentes renovables de energía, la pelea en contra de la pobreza y la marginación de las áreas rurales (Senado de la República, 2008).

Dentro de las nuevas estrategias que se adoptaron en el país se encuentra El Plan Nacional de Desarrollo (PND) 2007-2012 establece al Desarrollo Humano Sustentable

como su principio rector. El PND retoma los postulados del Informe Mundial sobre Desarrollo Humano (1994) del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, de acuerdo con los cuales “el propósito del desarrollo consiste en crear una atmósfera en que todos puedan aumentar su capacidad y las oportunidades puedan ampliarse para las generaciones presentes y futuras” (Alatorre, 2009), siendo este punto cardinal en la estrategia que ha tomado México como país comprometido con el desarrollo humano, Alatorre (2009), menciona que uno de los elementos en la consecución de este principio rector es la política para la sustentabilidad energética, que busca incrementar la eficiencia energética y el aprovechamiento de las energías renovables en México, con una visión de largo plazo.

Mientras que a partir del año 2015, la situación energética en nuestro país se vio modificada al entrar en vigor las leyes secundarias de la Reforma Energética promovidas por el gobierno del Presidente Enrique Peña Nieto, con puntos de importancia como:

- La terminación del monopolio de venta de gasolina para PEMEX, con planes de introducción de venta de particulares a partir del año 2017.
- La participación de empresas extranjeras en procesos de explotación a través de licitaciones expedidas por PEMEX o particulares.
- La explotación de recursos de la nación a través de la figura de “servidumbre legal de hidrocarburos” permitiendo el acuerdo con dueños particulares para obtener un porcentaje de entre el 0.5 al 3% sobre utilidades de producción en su defecto.
- Se creará la Agencia Nacional de Seguridad Industrial y de Protección al Medio Ambiente del sector hidrocarburos que tendrá la capacidad y responsabilidad sobre la protección, regulación y control tanto de las personas como del medio ambiente involucrado en dichos procesos de explotación y producción.

Dichas medidas precautorias son importantes ya que como según menciona Lean (2007), el suministro global de petróleo y de gas natural de fuentes convencionales es poco probable que cumpla con las demandas crecientes de los próximos 25 años, sin embargo la ejecución de las mismas debe regularse de manera estricta ya que la

explotación de hidrocarburos por métodos como el “fracking” mas que ayudar a que la oferta energética no caiga, trae consigo efectos sumamente adversos al medio ambiente como la contaminación de mantos freáticos y disturbios sobre placas tectónicas ofreciendo no mas que una “solución” a corto plazo.

2.2 Bioenergía

La bioenergía hace referencia a productos de biomasa que se han convertido a forma líquida, sólida o gaseosa, según la materia prima básica y la tecnología empleada para la generación de energía (IAASTD, 2009).

La importancia de la bioenergía recae principalmente en su manejo local, ya que la utilización de biomasa tradicional como la leña es usada por cerca del 38% de la población mundial. Con ejemplos en África y Asia donde más del 90% de la población depende de ella (Prugh, 2014).

Al basarse en materia orgánica, podemos encontrar opciones de importancia en la re-utilización de residuos de la agricultura, domésticos e incluso industriales. Al presente, el mundo consume cerca de 400 EJ (exajoules) de energía al año, pero genera aproximadamente una cantidad equivalente a 100 EJ de residuos de cultivos, en su mayor parte inutilizados, pudiendo producir unos 180 EJ adicionales a partir de cultivos de pastos y árboles dedicados a este fin.

Pese a este potencial, la bioenergía no debe considerarse como el único sustituto del petróleo, sino como un elemento en una cartera más amplia de fuentes de energía renovable (Hazell y Pachauri, 2006).

2.2.1 Biomasa

Es el material orgánico de origen biológico más importante y es producido por las plantas al sintetizar luz, agua y CO₂ mediante el proceso de fotosíntesis, en el que la energía solar queda almacenada en enlaces químicos y que a su vez puede ser liberada en forma de biocombustibles mediante procesos como la combustión, (Fig. 3) la digestión, la descomposición o bien mediante su hidrólisis y fermentación (Aguillón et al. 2010).



Fig 3. Ciclo de aprovechamiento de la energía solar y su transformación en biocombustible

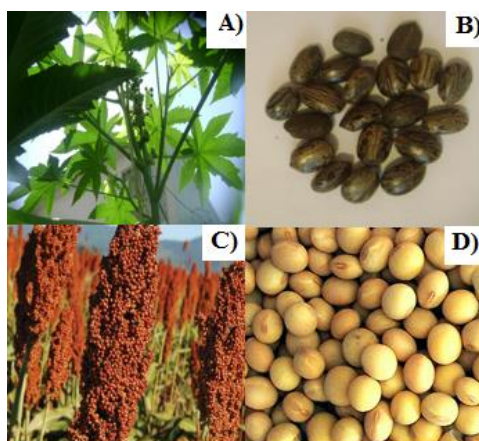


Fig. 4 A) Ejemplar de higuerilla (*Ricinus communis*). B) Semillas de higuerilla.
C) Ejemplo de panoja de sorgo (*Sorghum bicolor*). D) Grano de sorgo.

2.3 Biocombustibles

Los biocombustibles son alcoholes, éteres, esteres y otros compuestos orgánicos, producidos a partir de biomasa, como plantas herbáceas y leñosas, residuos de la agricultura, actividad forestal y en gran cantidad de desechos industriales, como los desperdicios de la industria alimenticia. Según la naturaleza de la materia prima y el tipo de combustible deseado, se pueden utilizar diversos procesos para su producción dentro de los cuales encontramos:

- Mecánicos: como astillado, trituración y compactación.
- Termoquímicos: como combustión, pirólisis y gasificación.
- Biotecnológicos: con microorganismos, enzimáticos y extractivos para obtener combustibles sólidos, líquidos o gaseosos.

Entre los biocombustibles se pueden incluir el bioetanol, biodiesel, biometanol, biogás entre otros, siendo los más desarrollados y empleados el bioetanol y el biodiesel (Stratta, 2000), si bien en la actualidad no todos son viables para una producción que sea competitiva con los combustibles de origen fósil deben cumplir con características importantes para ser considerados como combustible alternativo:

1. Poseer beneficios ambientales sobre los combustibles fósiles.
2. Ser económicamente competitivo con los mismos combustibles tradicionales.
3. Ser producible en cantidad suficiente para tener un impacto significativo en la demanda de energía (Hill et al. 2006).

Los principales usos de los biocarburantes son para la combustión; para producir calor aplicable a la calefacción urbana, en procesos de la industria o para la generación de electricidad; para motores térmicos y para su utilización en turbinas de gas (Regueiro, 2006). Biocombustibles como la leña, residuos forestales, carbón vegetal, y desechos agrícolas como la paja, bagazo y otros tienen amplio uso en la cocción de alimentos, el calentamiento de agua, además se puede obtener de ellos gas de pirólisis que se usa como energético en motores de combustión interna (Islas y Jiménez, 2009).

2.3.1 Biocombustibles líquidos

Dentro de los biocarburantes; aquellos en forma líquida como los aceites vegetales puros, los aceites vegetales esterificados (biodiesel) y el alcohol (etanol carburante) se pueden emplear en motores Otto y Diesel para automóviles, autobuses, camiones de carga o para producir electricidad y calor (Aguillón et al. 2010). Por su fuente y tecnología de obtención se pueden clasificar por generaciones.

2.3.2 Biocombustibles de Primera Generación

Utilizan materias primas de uso alimentario como el maíz, la caña de azúcar o la soja y tecnologías de proceso como la fermentación para el etanol y la transesterificación para el biodiesel (Biopact, 2007). También se consideran de primera generación las grasas animales y aceites vegetales reciclados (St. James, 2009)

2.3.3 Biocombustibles de Generación 1.5

Abarca a los biocombustibles producidos con las tecnologías convencionales y con las materias primas alternativas a las de mayor disponibilidad inmediata, menos sensible a la competencia con la producción de alimentos. Entre estas materias primas se encuentran diversas especies arbustivas o arbóreas perennes y otras alternativas con potencial para desarrollarse en zonas áridas o semiáridas y tierras marginales, degradadas o abandonadas, tales como el ricino, la *Jatropha*, el cardo, el sorgo dulce, el topinambur, entre otros (Sims et al. 2008).

2.3.4 Biocombustibles de Segunda Generación

Representan un cambio en la tecnología de conversión que permite reemplazar los azúcares, el almidón y los aceites de las materias primas utilizadas por la primera generación, por diversas formas de biomasa lignocelulósica (residuos agrícolas y forestales primarios y secundarios, hierbas perennes, árboles de crecimiento rápido, etc.). La conversión de biomasa lignocelulósica en biocombustibles de segunda generación además de representar una mayor participación potencial en la matriz energética y un avance significativo en términos de balance de carbono, dejarían atrás el dilema biocombustible vs. alimentos (Sims et al. 2008).

2.3.5 Biocombustibles de tercera generación

Son aquellos producidos a partir de tecnologías nuevas que siguen desarrollándose pero que mayormente no han llegado a ser comercialmente viables. Existen muchos ejemplos, pero el más notorio es un proceso de síntesis llamado Fischer-Tropsch, que convierte la celulosa a combustible a través de un proceso de gasificación de sólidos (St. James, 2009).

Utilizan métodos de producción similares en cultivos bioenergéticos específicamente diseñados o “adaptados” (a menudo por medio de técnicas de biología molecular) para mejorar la conversión de biomasa a biocombustible. Diversas líneas de investigación y desarrollo se ha centrado en el diseño de eucaliptos y álamos con bajo contenido de lignina, de cultivos de la primera generación con alto contenido de azúcar o de aceite y/o tolerantes a sequía, a condiciones de mayor aridez o desarrollos tendientes a aumentar el rendimiento en biomasa de los cultivos energéticos. (Manual de biocombustibles, ARPEL)

2.3.6 Biocombustibles de cuarta generación

Llevan la tercera generación un paso más allá. En los cultivos la clave es la captación y almacenamiento de carbono (CAC), tanto a nivel de la materia prima como de la tecnología de proceso. La materia prima no sólo se adapta para mejorar la eficiencia de proceso, sino que se diseña para captar más dióxido de carbono, a medida que el cultivo crece (Biopact, 2007).

Son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico (CO_2) o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles. A diferencia de las generaciones anteriores, en las que también se pueden emplear bacterias y organismos genéticamente modificados como insumo o para realizar alguna parte de los procesos, en la cuarta generación, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles.

Actualmente esta generación de biocombustibles se encuentra en fase teórica, sólo se conoce la posible ruta de síntesis del etanol a partir de anhídrido carbónico, sin

embargo, depende totalmente de la información genética de una bacteria artificial y puede tener limitaciones termodinámicas importantes (Álvarez, 2009).

2.4 Biodiesel

El biodiesel es un combustible de sustitución que representa una fuente de energía renovable, biodegradable, ambientalmente benigna que puede cumplir las necesidades energéticas sin sacrificar el rendimiento operacional del motor (Refaat, 2010). Por definición está compuesto de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos derivados de fuentes renovables como aceites vegetales o grasas animales (Ramadhas et al. 2004). Es sintetizado por una reacción química entre un aceite vegetal o animal en combinación con un alcohol, usando normalmente metanol puro o etanol. La mezcla es combinada con un catalizador (Dana, 2009). Representa un ciclo de dióxido de carbono en gran medida cerrado (aproximadamente 78%), ya que es derivado de fuentes renovables de biomasa (Fig. 5).



Fig. 5 Ciclo de producción y uso de biodiesel

Comparado al diesel de petróleo, el biodiesel tiene menos emisiones de contaminantes, y aumenta la lubricidad en los motores (Lotero et al. 2005) y es el primer y único combustible alternativo que ha tenido una evaluación completa de emisiones y efectos potenciales sobre la salud, realizada por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos, bajo la sección 211 de la Ley de Aire Limpio (Reoil México, 2009). Tiene un número más elevado de cetanos que el diesel de petróleo, no presenta aromáticos, ni azufre y contiene de un 10-11% de oxígeno por peso (Canacki, 2007). Sin embargo también presenta algunas desventajas a nivel técnico como son: problemas de fluidez a bajas temperaturas (menores a 0 °C), escasa estabilidad

oxidativa (vida útil/periodo máximo de almacenamiento inferior a 6 meses), incompatibilidad con plásticos y derivados del caucho natural (eventual sustitución de componentes de motor; mangueras, juntas, sellos, diafragmas, filtros y similares) (López, 2006).

2.4.1 Producción de biodiesel en el mundo

A nivel regional e incluso mundial, se ha observado un incremento en la producción y aceptación del biodiesel como fuente alternativa de energía a base de materia orgánica (Fig. 6). En cifras, en la Unión Europea se pasó de producir 1.9 millones de toneladas en el 2004 a 4.9 millones de toneladas en el 2006 (EBB, 2007), continuando en los años subsiguientes con una producción a la alza observándose con la producción combinada de países como Brasil, Estados Unidos de América, Indonesia, Malasia, China, Mozambique, Sudafrica y los 27 miembros de la Unión Europea que para el 2010 alcanzaron los 15 billones de litros (Biomass Research, 2013). Para el 2011 y 2012 la producción mundial tuvo un aumento hasta los 22.4 billones de litros y 22.5 billones de litros respectivamente, representando un 20% de la producción mundial de biocombustibles; siendo Estados Unidos el líder con una producción de 3.6 billones de litros, Argentina en segundo lugar con 2.8 billones de litros y finalmente Alemania y Brasil con 2.7 billones de litros cada uno, resumiendo su tendencia de crecimiento a una tasa promedio de aumento anual de 17% desde el 2007 al 2012 (Prugh, 2014).

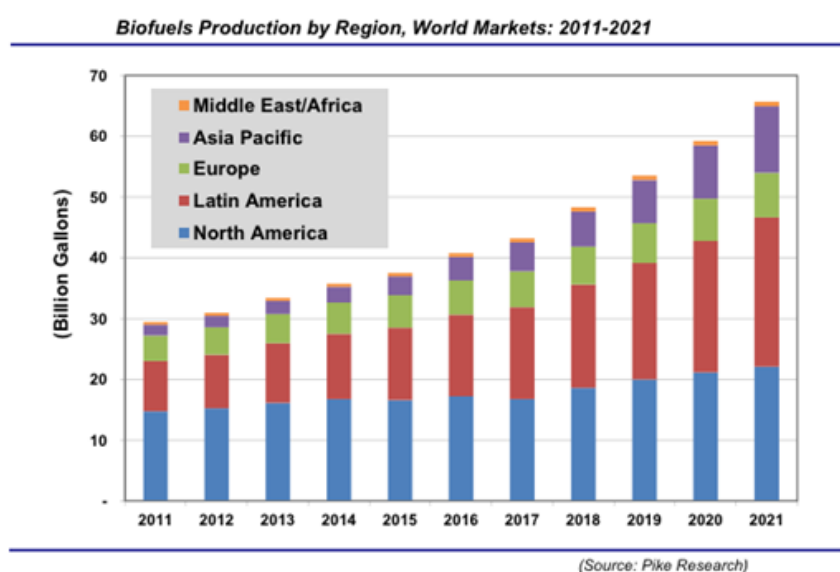


Fig. 6 Tendencia de producción de biocombustibles

2.4.2 Producción de biodiesel en México

Masera Cerutti et al. (2006), mencionan que para México la producción de biodiesel a escala comercial puede ser factible en el mediano plazo de realizar acciones integrales que deben incluir aspectos técnicos, económicos y medioambientales, de concertación con el sector agrario y agroindustrial así como un esfuerzo importante en investigación y desarrollo tecnológico; para una introducción de manera inmediata, la producción de biodiesel podría basarse sobre todo en el uso de materias primas de bajo costo como aceites y grasas recicladas, en el mediano plazo se requerirá la creación de esquemas de incentivos que de manera masiva puedan permitir la sustitución de entre el 2% y 5% del diesel de petróleo después del 2012.

Sin embargo, los esfuerzos para producción de biodiesel en México no han sido nulos, sin embargo es la iniciativa privada la que ha tomado el liderazgo con empresas como Biofuels de México, S. A. de C. V., Biodiesel MORECO® o SOLBEN® quienes en su mayoría trabajan con la recolección de aceites vegetales residuales o la producción de aceite a partir de Jatrofa.

2.5 Materia prima para obtención de biodiesel

2.6 Aceites vegetales

Están compuestos por 3 ésteres unidos a una molécula de glicerina; llamándole a esto, triglicérido (Kurki, 2006). Normalmente, hay 5 tipos principales de cadenas de ácidos grasos en los aceites vegetales y animales; siendo estos, palmítico, esteárico, oléico, linoléico y linolénico (Ma y Hanna, 1999).

En 1895 cuando Rudolf Diesel diseñó el prototipo del motor de diesel ya estaba previsto que funcionara con aceites vegetales y lo hizo, ya que las primeras pruebas realizadas en vehículos fueron mediante aceite de cacahuete (Quispe Márquez, 2008).

Si bien el hallazgo y la propuesta fueron prometedoras, el mayor obstáculo para la comercialización del biodiesel de aceite vegetal en comparación con el diesel de petróleo fue y es primariamente, el alto costo de los materiales crudos (Hass, 2005). Para este fin, Haas et al. 2006, repotan el desarrollo de un modelo computacional que

estima el capital y costo de operación de una planta de producción de tamaño moderado, el costo de producción incluyendo el costo de la materia prima y de su conversión a biodiesel; hablando en términos de la economía del proceso, se incluyen la recuperación del co-producto generado durante la producción de biodiesel, el glicerol, y su venta.

El modelo es flexible de tal manera que se pueden modificar considerando los efectos que presenta el cambio de materia prima, el valor del glicerol y cambios en la química y tecnología del proceso.

Entre los aceites más investigados se encuentran el aceite de girasol, soya, colza, palma, higuierilla y grasas animales (Tabla 1), siendo las tres primeras las más usadas para la producción de biodiesel en Europa y Norte América (Cardona Alzate, 2009), sin embargo hay otras fuentes de las cuales también se puede obtener este biocombustible.

Tabla 1. Rendimiento de cultivos oleaginosos por hectárea aptos para biodiesel

Soja (<i>Glicine max</i>): 420 litros
Arroz (<i>Oriza sativa</i>): 770 litros
Tung (<i>Aleurites fordii</i>): 880 litros
Girasol (<i>Helianthus annuus</i>): 890 litros
Maní (<i>Arachis hipogaea</i>): 990 litros
Colza (<i>Brassica napus</i>): 1100 litros
Ricino/tártago (<i>Ricinus communis</i>): 1320 litros
Jatrofa/tempate/piñón (<i>Jatropha curcas</i>): 1590 litros
Aguacate, palta (<i>Persea americana</i>): 2460 litros
Coco (<i>Cocos nucifera</i>): 2510 litros
Cocotero (<i>Acrocomia aculeata</i>): 4200 litros
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>): 5550 litros

(Biodiesel Uruguay, 2006)

2.6.1 Aceite residual

El término “aceite vegetal residual” (AVR) se refiere al aceite vegetal o animal que ha sido usado para producción alimenticia y que no es viable para el uso para el cual fue destinado, proviene de diferentes fuentes incluyendo domésticas, comerciales e industriales.

El desecho incorrecto del AVR puede ser problemático ya que normalmente se realiza a través de los fregaderos de cocina donde puede ocasionar bloqueos de las tuberías cuando el aceite se solidifica, así como también debido a sus propiedades puede conducir a la corrosión del metal y concreto (Refaat, 2010), y considerando lo mencionado por Masera Cerutti et al. (2006) en referencia al impacto directo de los aceites sobre la producción de biodiesel lo cuales representan entre el 59% y 91% de los costos de producción debido a insumos agrícolas, los AVR marcan una clara ventaja para su utilización.

El aceite vegetal residual tiene propiedades diferentes a las del aceite crudo y refinado, la viscosidad aumenta debido a la formación de ácidos diméricos y poliméricos, mientras la exposición al calor y al agua acelera la hidrólisis de los triglicéridos y aumenta el contenido de ácidos grasos libres (Cardona Alzate, 2009); dentro de estos parámetros, algunos que son clave para determinar la viabilidad del aceite vegetal para el proceso de transesterificación son; el índice de acidez, el contenido de ácidos grasos libres, el contenido de humedad, la viscosidad y el perfil de ácidos grasos (Refaat, 2010); este último es un determinante sustancial para las propiedades del biodiesel producido ya que se ha mostrado que las propiedades de varios ésteres de ácidos grasos están determinados por las características estructurales de los ácidos grasos y las fracciones del alcohol que componen al éster graso (Refaat, 2009).

2.6.2 Potencial del aceite vegetal residual

Grandes cantidades de aceite vegetal residual y de grasas animales están disponibles en el mundo especialmente en países desarrollados (Fig. 7), sin embargo el manejo de ellos ostenta un gran desafío ya que su desecho presenta una posible contaminación de agua y recursos terrestres aún y cuando parte de ellos son utilizados para producción de jabones (Chhetri et al. 2008).

En países miembros de la Unión Europea, la producción de aceite vegetal residual ronda en el rango de las 700,000-1, 000,000 toneladas/año (Kulkarni and Dalai, 2006). Mientras que en Estados Unidos se estima que aproximadamente 100 millones de galones de AVR son producidos diariamente donde el promedio per cápita esta

reportado en 9 libras (Radich, 2006) y el Reino Unido producen más de 200, 000 toneladas por año (Carter et al. 2005).

Major biodiesel feedstocks (2013)

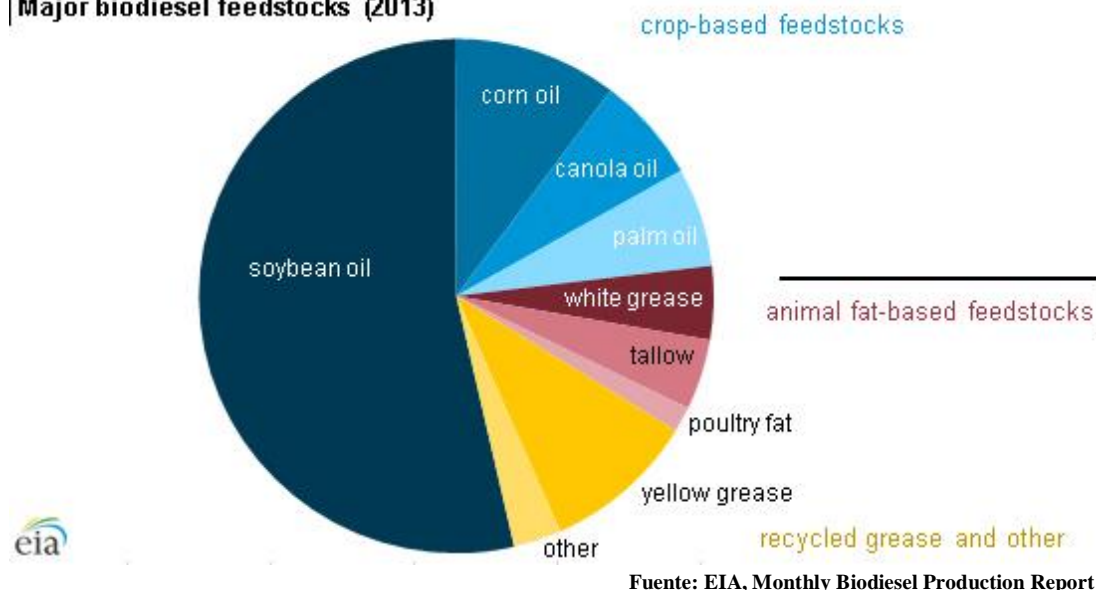


Fig. 7 Fuentes de obtención de aceite

En México el potencial de generación de aceites vegetales residual (AVR) se estima en un rango de 1.5 a 6 litros por persona con respecto a Japón que reporta 1.7 litros de AVR per cápita, mientras Estados Unidos presenta un valor de 5.5 litros por persona (Boatella y Codony, 2000).

2.6.3 Beneficios del uso de aceite vegetal residual

El biodiesel producido a partir de AVR beneficiadesde el punto de vista del análisis de su ciclo de vida, ya que el efecto en el ahorro de CO₂ es significativamente mas alto cuando se utiliza este como materia prima debido a que los efectos de la producción agrícola de aceites vegetales no son tomados en consideración. En numerosas investigaciones en las que se utiliza aceite vegetal residual se ha mostrado que el radio neto de energía (obtenido diviendo la salida de energía en un sistema por la demanda acumulativa de la misma) es de 5 a 6 comparado con el 2 a 3 del biodisel obtenido de soya o colza y 0.8 del petrodiesel (Rutz y Janssen, 2008).

Cabe mencionar que como materia prima, se han obteniendo resultados de producción con una calidad comparable a los obtenidos por medio de aceite vegetal virgen (Canakci, 2007; Chhetri et al. 2008; Refaat et al. 2008 citados por Refaat, 2010) por

lo que el uso de estos materiales crudos y baratos presentan el potencial para mejorar la viabilidad del biodiesel (Behzadi y Farid, 2007).

2.7 Transesterificación

La vía para la obtención de biodiesel es la transesterificación de aceites y grasas con un alcohol de bajo peso molecular, en presencia de un catalizador adecuado (Fig. 8) (Crespo et al. 2001). Cuando los triglicéridos reaccionan con el alcohol, las tres cadenas de ácidos grasos son liberadas del esqueleto de la glicerina y se combina con el alcohol para dar como resultado un éster de alquilo (Zhang et al. 2003).

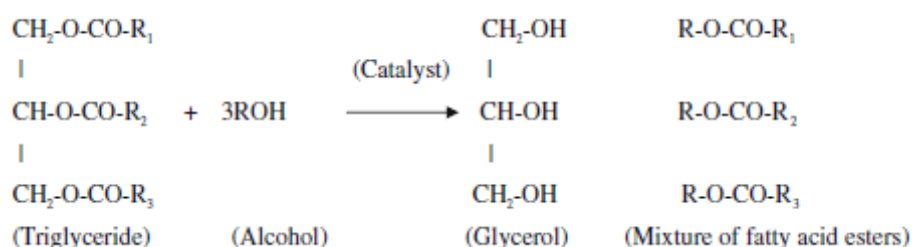
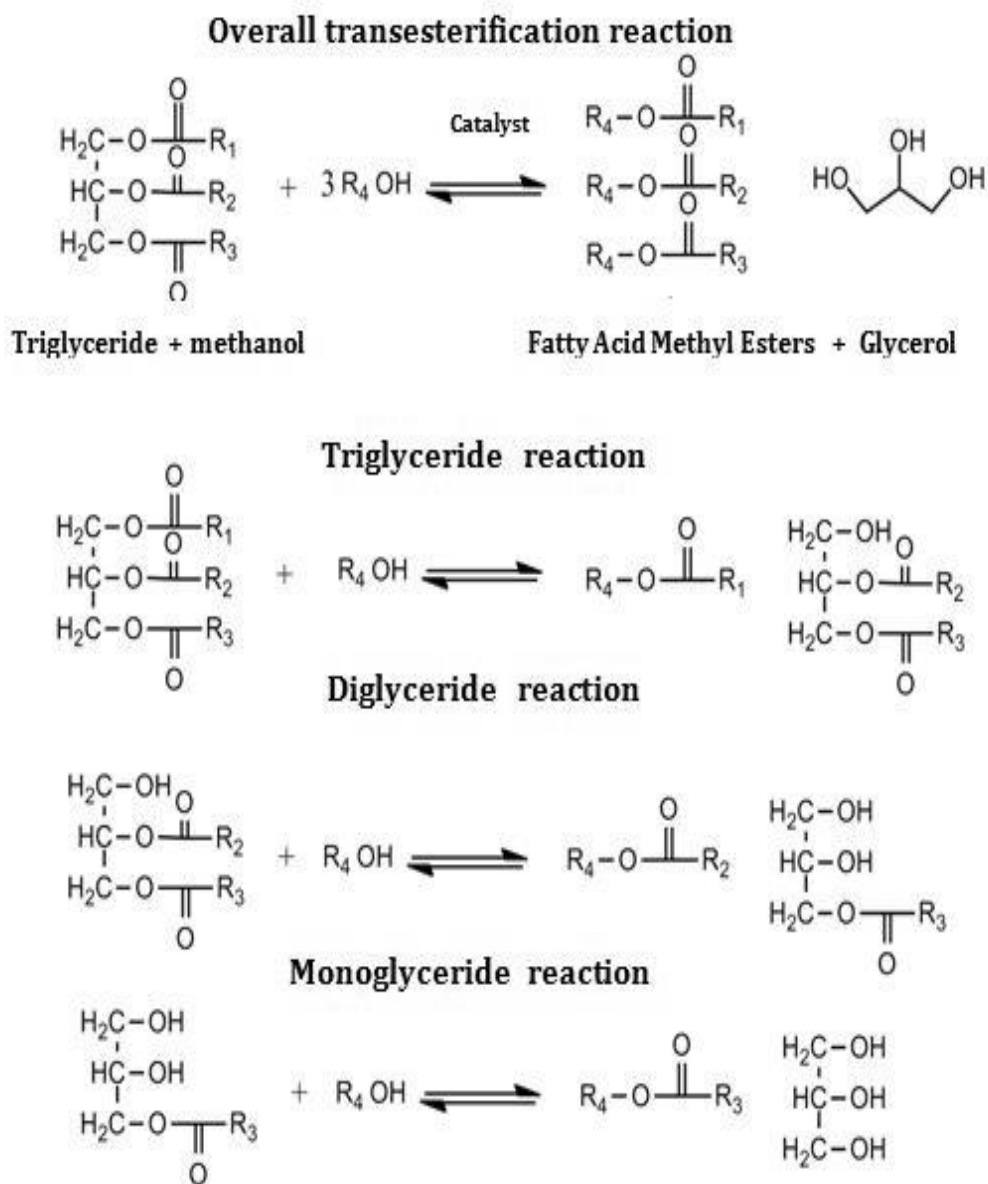


Fig. 8 Ecuación general de transesterificación (Leung et al., 2010)

Este proceso fue patentado en los años 40 cuando surgieron importantes usos de los esteroides, los cuales fueron producidos mediante una reacción catalítica básica económica y simple. (Hilbert, 2008), la transesterificación. Es la técnica más comúnmente usada ya que requiere bajas temperaturas y presión; produce más del 98% de conversión (considerando el contenido de humedad y ácidos grasos libres del aceite) e involucra la conversión directa a biodiesel sin compuestos intermediarios (Singh et al. 2006).

Sin embargo presenta algunas limitaciones, como su sensibilidad al contenido de ácidos grasos libres en la que una cantidad mayor a (>1% v/v) causa un aumento en la viscosidad, formación de geles y dificulta la separación de la glicerina, así como también la presencia de agua que produce hidrólisis sobre los esteroides producidos recomendando que los aceites usados para transesterificación sean substancialmente anhidros (0.06 p/p) (Leung and Guo, 2006; Arun, 2011).

Químicamente, el mecanismo de transesterificación consiste en 3 reacciones consecutivas reversibles (Fig. 9) en las que el triglicérido es convertido consecutivamente en diglicérido, monoglicérido y glicerol liberándose 3 mol de éster metílico y 1 mol de glicerol (Crespo et al. 2001; Highina et al. 2011).



(Drapcho et al. 2008)

Fig. 9 Reacción de transesterificación

2.7.1 Condiciones de operación para transesterificación

Las principales variables que influyen en el rendimiento de la reacción de transesterificación son la calidad de la materia prima, el tipo y cantidad de catalizador,

el alcohol, la relación molar alcohol/aceite y las condiciones de reacción como temperatura, presión y agitación y el contenido de ácidos grasos libres (Benjumea et al. 2003; Math et al. 2010; Refaat, 2010; Gnanaprakasam et al. 2013)

2.7.2 Catalizadores

En el laboratorio, se considera que la determinación del catalizador es el primer paso para el diseño del sistema de transesterificación (Lee y Lee, 2009).

2.7.3 Catalizadores alcalinos

Para la catálisis alcalina es muy importante que los catalizadores se mantengan en un estado anhidro. Debe evitarse su contacto prolongado con el aire, pues éste disminuye su efectividad debido a la interacción con la humedad y con el dióxido de carbono (Meher et al. 2006). Los catalizadores alcalinos más comúnmente utilizados son los hidróxidos de metales (NaOH, KOH), su uso en pequeñas cantidades de 1-2%, completa la reacción en pocas horas (Lee y Lee, 2009; Cvengros y Cvengrosová, 2004; Singh et al. 2006; Kaieda et al. 1999; Meher et al. 2006; Srivastava y Prasad, 2000; Schuchardt et al. 1998; Marchetti et al. 2008; Robles et al. 2009).

Dentro de los más comunes está el hidróxido de potasio, el cual se disuelve más fácilmente en metanol y es menos sensible al agua y adicionalmente el glicerol o glicerina obtenido como co-producto resultante del procesamiento con KOH permanece líquido y es más fácil de desechar y puede ser añadido de manera más segura a pilas de composta y utilizarse en cantidades pequeñas como suplemento para alimentación de animales como rumiantes o animales de granja y aplicarlo como fertilizante. Al contrario, con la utilización de hidróxido de sodio se obtiene contaminación del agua utilizada para los lavados con sales convirtiéndola en inutilizable para aplicación en tierra, mientras que el glicerol obtenido por medio de NaOH presenta sus propias ventajas: hace una base superior para jabones o desengrasantes (Dana, 2009). Considerando dichas características, este método se selecciona por su efectividad en la reducción de ácidos grasos libres, incluyendo fosfolípidos y pigmentos (Bhosle y Subramanian, 2005; Sudhir et al. 2007).

2.7.4 Catalizadores ácidos

En el mercado actual, la mayor parte de la producción de biodiesel se lleva a cabo por transesterificación alcalina, siguiendo en segundo lugar la producción por catalizadores ácidos, considerada la mejor opción para transformar ácidos grasos libres (AGL) en ésteres (Van Gerpen, 2005; Kumar et al. 2007) dentro de los que se encuentran el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido sulfónico. Estos catalizadores presentan ventajas importantes, como el alto rendimiento que brindan, sin embargo, estas ventajas se ven opacadas ya que en general, las grasas animales, necesitan un proceso de doble etapa, un primer proceso de esterificación ácida, empleando un catalizador ácido, siendo el más usado el ácido sulfúrico y posteriormente una etapa de transesterificación o alcoholisis básica (Rivas, 2008) la cual requiere de una mayor cantidad de alcohol que aquellas que son alcalino-catalizadas (Canacki, 2007). La transesterificación ácido-catalizada permite tener productividad más alta de ésteres pero sufre de una tasa de reacción lenta cuando es comparada con la transesterificación alcalina lo que resulta en un proceso largo y presenta la necesidad de utilizar insumos de energía elevados, logrando hasta el 100% de conversión con radios molares de metanol/aceite de 30:1 a 65 °C. (Lee y Lee, 2009; Freedman et al. 1984; Bacovsky et al. 2007; Xu y Du, 2003).

Si bien las técnicas de transesterificación tanto alcalina como ácida tienen pros y contras, la unión de ambas en lo que se conoce como transesterificación en 2 pasos ha probado ser de gran utilidad para aquellas materias primas que presentan una acidez mayor a 1%). Issariyakul et al. (2007) reporta el trabajo realizado con grasas con 5-6 % de AGL mostrando 90% de conversión a ésteres comparando con el 50% obtenido por transesterificación alcalina. Cayli and Küsefoglu (2008) reporta una mejora de 86% a 96% por este método y Encinar (2007) reporta resultados similares en los que se incrementó el rendimiento por 30% en relación a la transesterificación en un paso.

Siendo ambas técnicas atractivas desde el punto de vista de rendimiento y transformación el siguiente paso lógico es realizar una evaluación preliminar de los insumos que servirán como materia prima así como también un análisis de costos donde se contraste la inversión requerida en materia de insumos consumibles e irre recuperables como es el caso de los catalizadores químicos.

2.8 Alcohol y relación molar

Alcoholes de cadena corta como el metanol, etanol y butanol son los más frecuentemente utilizados para la transesterificación, sin embargo cabe resaltar que el uso de diferentes alcoholes no presenta diferencias con respecto a la cinética de la reacción por lo que el rendimiento final de los esteres producidos se mantiene inalterable (Encinar et al. 2007), volviéndose de mayor importancia el radio molar del alcohol:aceite vegetal a utilizar.

Observándose que al utilizar radios mayores a 6:1 no se incrementa la producción de metil ésteres y se complica la recuperación de los mismos y el glicerol, dependiendo del aceite vegetal a utilizar se recomienda que el rango de trabajo al emplear catalizadores químicos alcalinos vaya de una proporción de 6:1 pudiendo llevar la reacción hasta 35:1 o mayor (Zhang et al. 2003; Kang and Wang, 2003), lo que conlleva a establecer la relación alcohol/aceite empíricamente (Schuchardt et al. 1998).

El uso de solventes orgánicos para transesterificación enzimática puede tener más de un propósito, evita la formación de 2 fases entre los reactivos y reduce la viscosidad incrementando la tasa de difusión reduciendo los problemas de transferencia de masa alrededor de la enzima (Fjerbaek et al. 2009). Sin embargo puede llegar a existir un problema de baja solubilidad del alcohol con los demás componentes de la reacción, el cual es frecuente ya sea por la naturaleza de la materia prima o el alcohol utilizado dándose el recubrimiento de la enzima por la glicerina (Royon, 2007), por lo que se recomienda el empleo de la técnica de adición escalonada de alcohol aplicado a diversos tiempos evitando de esta manera la inactivación del catalizador (Lu, 2007).

Para la transesterificación enzimática, se ha reportado que la reacción depende tanto del alcohol como del catalizador (lipasas) utilizado (Nelson et al. 1996). Como ejemplos de esto, la lipasa de *M. miehei* es más eficiente con alcoholes primarios, ya que características como su bajo peso molecular y su alta polaridad permiten que tenga un mayor contacto con la enzima (Hama, 2004). Mientras que la lipasa de *C. antarctica* lo es con alcoholes secundarios, esta característica se debe a que algunas lipasas son más eficientes con alcoholes de cadena larga que con aquellos de cadena corta (Fukuda, 2001).

Existen enzimas que soportan mayor concentración de alcohol que otras, como *P. fluorescens*, la cual mantiene su actividad hasta una relación de 4.5:1 (Soumanou y Bornscheuer, 2003), esto puede deberse a que como se ha observado en cepas de *Pseudomonas* los ácidos grasos insaturados de la membrana celular se isomerizan de *cis* a *trans* modificando sus patrones de fluidez haciéndola más tolerante a solventes orgánicos (Heipieper, 1994).

2.9 Temperatura de reacción

La temperatura de reacción no presenta un efecto detectable en la conversión de ácidos grasos a metil esteres; sin embargo, altas temperaturas disminuyen el tiempo requerido para alcanzar la máxima conversión (Pinto et al. 2005).

Aunque la alcoholisis alcalina de los aceites vegetales normalmente se conduce cerca del punto de ebullición del alcohol se ha observado que puede llevarse a cabo a temperatura ambiente (Freedman et al. 1984) con un rango reportado dependiendo del aceite entre 50°C y 60 °C (Leung et al. 2006; Van Gerpen, 2005).

En el caso de la transesterificación enzimática la temperatura de reacción es más baja que la utilizada en catálisis química debido a que altas temperaturas provocan procesos de desnaturalización de proteínas (Lu, 2007) y favorece la reacción de hidrólisis (Noureddini, 2005).

El rango de temperatura más utilizado en la catálisis enzimática está entre 35-50 °C (Rojas González, et al. 2010; Fjerbaek et al. 2009). Se ha observado que el rendimiento *R. miehei*, a 35, 40 y 45°C nos da valores de 37, 43 y 63%, respectivamente, lo que muestra que al aumentar la temperatura de reacción, dentro del rango limitado por la enzima, el rendimiento aumenta (Soumanou y Bornscheuer, 2003), habiendo reportes (Köse, 2002) de rendimientos del 90% utilizando temperaturas fuera del rango mayormente utilizado, en este caso a 60 °C al transesterificar aceite de semillas de algodón con *Candida antarctica* en estado libre.

2.10 Tiempo de reacción

Existen reportes varios en los que se ha determinado un tiempo de reacción óptima a los 60 min (Tomasevic y Siler-Marinkovic, 2003; Refaat et al. 2008; Reefat 2010),

señalando que un exceso en el tiempo de reacción no incrementa la conversión pero favorece la reversión de la misma (hidrólisis de ésteres) lo que resulta en la reducción de la productividad causando pérdida de éster y formación de jabón (Leung y Guo, 2006).

En la catálisis enzimática este parámetro puede ser mayor que el utilizado en la catálisis química y ampliamente variable obteniendo resultados que dependerán tanto de la materia prima, como de la lipasa utilizada, con resultados desde 1 h, 8h, 48 h, 60 h, 90, 168 h etc. (Noureddini et al. 2005; Li W., et al. 2007; Ülker et al. 2011; Fjerbaek et al. 2009).

2.11 Transesterificación enzimática

La producción de biodiesel y su enfoque enzimático han sido extensamente reportados, (Du et al. 2008) ya que el uso de esta tecnología en la conversión comercial de aceites y grasas a biodiesel reduce las limitaciones respecto a las materias primas, el procesamiento posterior y el impacto ambiental (Jegannathan et al. 2008) que podrían significar los aceites vegetales vírgenes.

Para el uso de enzimas existen factores críticos: el principal es el alto costo de producción de la enzima; la cantidad de agua presente en el medio de reacción ya que existe un mínimo de contenido de agua que es requerido por la lipasa, por debajo del cual no funciona; la tolerancia al metanol; si bien no todas las lipasas son capaces de catalizar dichas reacciones en solventes orgánicos, existen ejemplos de enzimas que presentan funcionalidad en metanol con adición de agua lo que presenta una clara ventaja al momento de sintetizar biodiesel (Klibanov, 1983; Teng y Xu, 2007), su termo estabilidad, ya que la reacción se lleva a cabo a 60 °C y al incrementarse puede provocar procesos de desnaturalización y finalmente la materia prima, ya que no todos los aceites presentan la misma cantidad o tipo de ácido graso, lo que puede influir en la especificidad de la lipasa y su determinada atracción hacia un aceite u otro (Cerveró et al. 2008; Marchetti, 2008; Robles et al. 2009; Balcao et al. 1996).

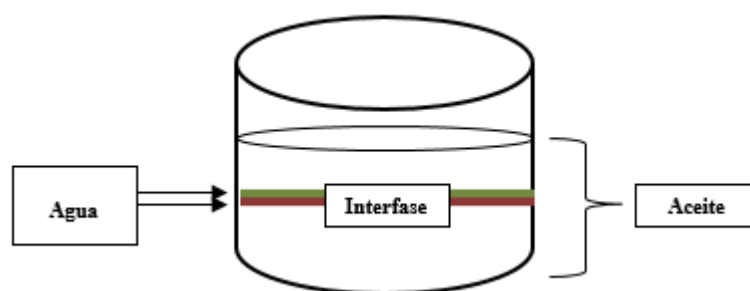


Fig. 10 Esquema de acción del catalizador enzimático

Tomando en cuenta todos estos factores, mediante el uso de catalizadores biológicos como las lipasas y el aprovechamiento de su capacidad de hidrolizar y sintetizar triglicéridos con especificidad posicional y de ácido graso (Hou y Johnston, 1992), se pueden llevar a cabo la esterificación y transesterificación, dos reacciones típicas productoras de biodiesel (Krishna y Karanth, 2002). Según lo reportado por Chen et al. (2006) la conversión enzimática utilizando lipasas inmovilizadas de *Rhizopus oryzae* se evaluó analizando parámetros incluyendo la relación molar metanol-aceite, la carga de biocatalizador y la adición de metanol. No observaron inactivación de la lipasa presuntamente debiéndose a la adición escalonada de metanol. Bajo condiciones óptimas el rendimiento obtenido fue de hasta 90%.

2.11.1 Presencia de agua

Mientras que para la transesterificación química se recomienda que el aceite que se va a trabajar sea lo más anhidro posible ya que la presencia de agua produce hidrólisis sobre los esteres producidos (Leung and Guo, 2006) en el caso de la transesterificación enzimática la protección del agua sobre la enzima es de gran importancia y su remoción puede llevar a cambios tanto reversibles como irreversibles en su estructura (Miller et al. 1988; Yamane, 1987 citado por Fjerbaek et al. 2009).

2.11.2 Intensidad del mezclado

En la transesterificación química este parámetro es importante ya que por medio de la agitación podemos crear la interface en la que se llevará a cabo la reacción, sin embargo, en la catálisis enzimática este parámetro es sustancial desde el inicio de la reacción, ya que una vez alimentados los reactivos se forma un sistema de tres fases inmiscibles entre el aceite, el metanol y la enzima (Meher et al. 2006; Singh y Fernando, 2006) por lo que en este tipo de catálisis se aconseja una velocidad de agitación entre 150–200 r. p. m. para no afectar la estructura de la lipasa (González Rojas, et al. 2010).

2.11.3 Beneficios de la transesterificación enzimática

Por medio de esta técnica se presenta la habilidad de esterificar ácidos grasos libres y triglicéridos de forma simplificada utilizando enzimas soportadas, no requiere lavados, no existe formación de jabón, permite obtener glicerol de mejor calidad lo que facilita su comercialización, permite trabajar con materia prima de calidad variable como aceites vegetales residuales y grasas animales sin importar que presenten un nivel de acidez elevado y contenido de agua (Shimada et al. 2002; Narasimharao et al. 2007; Tamalampudi et al. 2008; Fjerbaek et al. 2009).

Sin embargo, aún y considerando las ventajas que propone el enfoque enzimático, uno de los mayores problemas con el uso de lipasas es que la enzima conlleva el 90% del costo de la producción, mientras que químicamente un problema que se presenta habitualmente es la inactivación por metanol y la formación de una segunda fase que inactiva la enzima (Shimada et al., 1999; Soumanou and Bornscheuer, 2003; De Paola et al. 2009; Dizge et al. 2009; Matassoli et al. 2009).

2.12 Catalizadores biológicos

Las enzimas, catalizadores biológicos que permiten que se lleven a cabo reacciones dentro de los organismos vivos y responsables capaces de acelerar los procesos en los cuales se involucran por medio de la reducción de energía han permitido llevar a cabo ciertos procesos de producción con enfoques más benéficos al ambiente (Ghaly, et al. 2010), uno de ellos, la producción de biodiesel utilizando enzimas lipolíticas.

Las lipasas, como catalizadores presentan claras ventajas sobre los catalizadores químicos:

- Especificidad.
- Reutilización.
- Capacidad de inmovilización.

Pueden ser modificadas genéticamente para mejorar su eficiencia, aceptar nuevos sustratos, ser más termoestables y al ser naturales, se consideran como catalizadores “verdes” (Akoh et al. 2007) lo cual es de suma importancia ya que la conservación de los recursos, en este caso el agua que se utiliza para los lavado del biodiesel producido debe ir de la mano con aquellos conceptos que involucran la reutilización de recursos (AVR).

2.12.1 Uso de las lipasas como biocatalizadores

Las lipasas fueron descubiertas por primera vez en 1856 por Claude Bernard cuando estudiaba el papel del páncreas en la digestión de grasas (Petersen y Drablos, 1994), son parte de la familia de las hidrolasas, catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en la interfase lípido-agua, gracias a la estructura específica de 3 dominios; mediante el dominio de contacto responsable de distinguir la superficie del sustrato, el dominio hidrofóbico, por medio del cual se extrae una molécula de sustrato y se asocia con el tercer dominio presente, el funcional (Guncheva & Zhiryakova 2011; Panalotov y Verger, 2000; Stoytcheva et al. S/A; Salis et al. 2005; Martinelle et al. 1995).

Pueden llevar a cabo la esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos (Houde, 2004). Son en su mayoría extracelulares y su producción es altamente influenciada por la composición del medio además de los factores físico-químicos como la temperatura, pH, y oxígeno disuelto siendo que muchos microorganismos son conocidos como productores potenciales, incluyendo bacterias, levaduras y hongos (Abada, 2008).

La forma de acción de las lipasas sobre la molécula de triglicéridos presenta diferencias de acuerdo a la selectividad de la enzima sobre una región específica y por esta característica las lipasas pueden ser clasificadas (Chandler, 2001).

Lipasas con especificidad 1,3 actúan sobre las posiciones externas de la molécula, lipasas con especificidad 2 atacan los enlaces éster del medio y aquellas no específicas no muestran preferencia sobre la posición del enlace (Macrae, 1983), aunque existen reportes contradictorios respecto a la selectividad de lipasas, aquellas lipasas que hidrolizan enlaces éster de triglicéridos en las posiciones sn-1 y sn-3 pero no en sn-2 son preferidos por su especificidad.

Para el caso de las lipasas producidas por *Rhizopus*, éstas presentan una fuerte especificidad de posición 1,3 (Yan et al. 1999; Ul-Haq et al. 2002). Reportes mencionan que aquellas enzimas selectivas de regiones específicas no se consideraban aplicables a la producción de biodiesel ya que no actúan en todos los enlaces éster de las moléculas, presentándose como la más utilizada dentro de esta categoría a *Candida antarctica*, obteniendo rendimientos arriba del 90% lo cual se explica por la migración espontánea del grupo acilo (Fukuda et al. 2001; Akoh et al. 2007; Robles et al. 2009; Ghaly, et al. 2010; Lee y Dordick, 2002) lo que nos muestra que la elección de la enzima dependerá de la reacción a realizar.

El mayor factor para la expresión de la actividad de las lipasas ha sido siempre la fuente de carbono ya que son enzimas inducibles. Estas enzimas son generalmente producidas en presencia de lípidos como aceite u otro inductor como triglicéridos, ácidos grasos, ésteres hidrolizables y glicerol (Gupta et al. 2004).

La importancia de las lipasas desde el punto de vista biotecnológico puede ser observada por el gran número de artículos publicados recientemente, de hecho en los últimos años ha existido un incremento creciente en el número de publicaciones relacionadas a las aplicaciones industriales de las reacciones catalizadas por lipasas, llevadas a cabo en solventes orgánicos, líquidos iónicos o sobre solventes no convencionales (Treichel et al. 2010).

2.12.2 Lipasas extracelulares

Las lipasas microbianas son en su mayoría extracelulares, producidas por fermentación sumergida o fermentación en estado sólido, para su utilización como biocatalizador mediante estos procesos comúnmente se debe seguir con un paso de purificación lo que determinará su uso como biocatalizador (Balaji y Ebenezer, 2008; Barberis et

al. 2008; Ghaly et al. 2010) desafortunadamente el costo de los procesos de purificación es elevado lo que afecta a la viabilidad del proceso de producción (Bandmann et al. 2000; Joseph et al. 2008) para estos fines.

2.12.3 Lipasas intracelulares

Considerando que uno de los mayores obstáculos para el desarrollo de la transesterificación enzimática recae en los costos de producción del catalizador, los cuales incluyen extracción, purificación y concentración de la enzima, podemos ver como una opción viable a aquellos microorganismos que presenten capacidad de producción de lipasas intracelulares y sean susceptibles de inmovilización, como es el caso de las células fúngicas, las cuales representan opciones atrayentes para el desarrollo de procesos de producción de biodiesel (Iftikhar et al. 2008) con ejemplos de microorganismos que ya han sido utilizados como biocatalizadores en célula completa como *Candida antarctica*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*, (Fukuda et al. 2008; 2009; Robles et al. 2009). Siendo las más comúnmente utilizadas Novozym 435 proveniente de *Candida antarctica*, Lipozyme RM IM de *Rhizomucor miehei* and LipozimaTL IM de *Thermomyces lanuginosus* (Robles et al. 2009).

Conociendo esto, si un organismo que produce lipasas puede ser preparado y cultivado en grandes cantidades en condiciones de costos moderados convertiría al uso de estos biocatalizadores en una alternativa de bajo costo para la transesterificación de aceites con alto contenido de ácidos grasos libres (Jin y Bierma, 2010) presentando ventajas, como la eficiencia de conversión debida a su estabilidad (Klibanov, 1983; Ranganathan et al. 2008) y su vez desventajas al bajar la velocidad de los procesos (Robles et al. 2009).

2.12.4 Fuentes de obtención de lipasas

Las lipasas pueden ser encontradas tanto en plantas como en animales, hongos o bacterias, siendo aquellas de origen microbiano las que presentan una amplia variedad de actividades catalíticas, son fácilmente manipulables genéticamente y tienen un

rápido crecimiento en medios poco costosos, siendo adicionalmente a esto estables a las fluctuaciones estacionales (Schmidt-Dannert 1999; Aysun, 2009).

Dentro de las bacterias; Gram positivas como Gram negativas han sido reportadas como productoras de lipasas siendo el género *Pseudomonas* el más importante de las de Gram negativas contando por lo menos con 7 especies productoras de lipasas. *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fragi*, *P. glumae*, *P. cepacia*, *P. fluorescens* y *P. putida* (Jaeger, et al. 1994). Con ejemplos directos sobre producción de biodiesel como el Reportado por parte de Salis et al. 2005 con *Pseudomonas cepacia* teniendo una producción de 100% de biodiesel después de 6 horas.

Para las Gram positivas, uno de los géneros de mayor importancia es *Bacillus*, el cual exhibe propiedades que lo ponen como candidato potencial para aplicaciones biotecnológicas con especies productoras de lipasas reportadas, entre las cuales están: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus alcalophilus*.

Adicionalmente, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cepacia*, y *Staphylococcus caseolyticus* también han sido reportadas como productoras de lipasas. (Treichel et al. 2010; Jaeger et. al. 1999; Van Der Walle, 1927; Wu y Linko, 1996).

Se sabe que los mohos son productores de lipasas y presentan estabilidad y un gran potencial catalítico (Hameed, 1997) lo que los hace viables para aplicación industrial, por lo que para hongos los géneros representados con las especies más productivas de lipasas son *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Geotrichum* y *Trichoderma*; especies del género *Rhizopus* como *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus niveus* y *Rhizopus oryzae* son algunas de las especies más productivas de lipasas y para levaduras el género *Candida* con sus especies *Candida antarctica* y *Candida cylindracea* (Godtfredsen, 1990; Ghosh et al. 1996; Rubin and Dennis, 1997; Pogori, et. al., 2007; Adinarayana et al., 2004; Karanam y Medicherla, 2008; Kashmiri et al. 2006; Xia et al. 2011; Okumura, et. al. 1979; Yamaguchi y Mase, 1991; Chang Chang y Shaw, 1987; Shafei y Allam, 2010).

2.13 Detección de actividad enzimática

Para detección de actividad enzimática existen diversos métodos, algunos de los más populares incluyen aquellos que son tritrimétricos y colorimétricos sin embargo cuando es necesario realizar un *screening* de muestras numerosas no son efectivos (Bier, M., 1955; Peled y Krenz, 1981).

Con la finalidad de realizar una detección visual, los métodos en placa son útiles; utilizando sustratos basados en esteres de ácidos grasos como la tributirina, el triglicérido más simple encontrado en grasas y aceites naturales, utilizado ya que es hidrolizado por microorganismos que no son capaces de hidrolizar otros triglicéridos con cadenas de ácidos grasos más grandes (Alford, et al. 1967; Frayer et al. 1967).

Para 1987, Kouker and Jaeger (1987) presentaron un nuevo ensayo para detección de lipasas en bacterias utilizando un medio que contenía aceite de oliva y rodamina b como indicador.

La detección se llevaba a cabo por medio de observación de halos de fluorescencia naranja observados a 350 nm proveniente de los complejos formados entre el tinte y la acción de las lipasas sobre el aceite liberando ácidos grasos a partir del aceite de oliva, el cual aún es ampliamente utilizado (Castro-Ochoa et al. 2005; Bartasun et al. 2013).

Si bien la adición de aceites es efectiva para detectar la presencia de actividad lipolítica, la cuantificación mediante ácidos grasos unidos a moléculas que permiten su detección por métodos espectrofotométricos brinda la posibilidad de realizar una determinación mas precisa de la capacidad enzimática de la muestra en cuestión. El nitrofenil palmitato es un sustrato ampliamente utilizado, adicional a otros ésteres como el para nitrofenil caprilato, el para nitrofenil acetato y el para nitrofenil valerato que también pueden ser utilizados (Amara et al. 2009; Gupta et. al. 2002). Mediante el uso de dicho éster se realiza una estimación colorimétrica a 410 nm del para-nitrofenol liberado como resultado de la hidrólisis del sustrato (nitrofenil palmitato) lo que permite definir una unidad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 mol de para-nitrofenol por minuto (Gupta, et al. 2002).

2.14 Inmovilización enzimática

Las enzimas pueden ser unidas a su soporte por medio de interacciones que van desde adsorción física y enlaces iónicos a uniones covalentes estables. Clasificándolas en 2 amplias categorías: uniones reversibles o irreversibles (Gupta and Matiasson, 1992).

Para el caso particular de la producción de biodiesel, la utilización de enzimas como bio-catalizadores por medio de la inmovilización en soportes poliméricos permiten la interacción con la interfase lípido/agua y permiten su recuperación y posterior rehúso lo que presenta importantes ventajas ya que por la plasticidad de la actividad lipolítica y la protección que le brinda el soporte permite la utilización de muestras dentro de un rango más amplio de calidad (contenido mayor a 1% de ácidos grasos libres).

La elección de un acarreador debe considerar que sea de bajo costo, que presente resistencia tanto mecánica como microbiana, que presente una estabilidad térmica, funcionalidad, estabilidad química y que permita obtener una transferencia de masas suficiente para optimizar la eficiencia de la reacción, entre otras. (Dizge et al. 2009; Malcata et al. 1990; Jegannathan et al. 2008; Ruckenstein and Wang, 1993; Silva, et al. 2012) todas estas características son favorecidas si el acarreador adecuado se elige en relación a la reacción a realizar.

Sin embargo, la inmovilización también presenta dificultades, como en caso del atrapamiento; en el cual la membrana presenta limitaciones ya que moléculas muy grandes como los metilésteres de ácidos grasos tienen que difundirse a través de pequeños poros para llegar a la enzima mientras reactivos como el metanol tienen que viajar por los canales llenos con aceite, habiéndose reportado limitaciones de transferencia externa de masa en la mayoría de los casos (Fjerbaek et al. 2009; Antczak et al. 2009; Malcata et al. 2009).

Para la producción de biodiesel, existe una complicación adicional a la dificultad de intercambio de material; la formación de películas de glicerol, para este efecto se han reportado provocando tanto disminución de actividad enzimática en lipasas inmovilizadas como incremento en su estabilidad, ambos contradictorios, lo cual

puede explicarse de manera probable considerando que el glicerol tenga un efecto por la limitación de masa que provoca la inhibición de la enzima como tal (Fjerbaek, et al. 2009). Otros reportes que pueden explicar la interacción del glicerol mencionan que por su naturaleza química aquellos ácidos grasos que son más grandes a su vez son más hidrofóbicos, lo que provoca que aumente la disminución de la tasa de reacción con glicerol adsorbido en comparación con aquellas reacciones en las que no lo está lo que sugiere la formación de una capa hidrofóbica de agua y glicerol en el soporte lo que a su vez disminuye la velocidad de la reacción (Dossa, et al. 1999).

Según Watanabe et al. (2006) los resultados que favorecen la estabilidad enzimática presentan una explicación, en su investigación quien utilizó un pre-tratamiento para la lipasa con una solución de aceite, oleato de metilo y metanol, con la finalidad de que dicha solución se introduzca en el acarreador y ocupe el lugar de forma primaria y evite el acceso del glicerol, obteniendo resultados favorecedores.

De 2005 a 2011 se ha observado una variedad de matrices usadas y los métodos aplicados incluyen adsorción, atrapamiento y/o encapsulación y unión covalente. (Stoytcheva, et al. S/A).

Si bien existen numerosas ventajas en la utilización de lipasas inmovilizadas para producción de biodiesel como la estabilidad de operación, mayor rendimiento de la actividad de la enzima después de su inmovilización, resistencia a condiciones ambientales, un mayor potencial para múltiples procesos así como una reducción efectiva de costos (D'Souza, 1982) se debe considerar el proceso más adecuado de acuerdo al microorganismo del cual se obtiene la enzima y las características del proceso a realizar.

2.14.1 Tipos de inmovilización

Existe diversos métodos de inmovilización de enzimas pueden ser diferenciados en dos categorías generales: por retención física y mediante enlace químico (Arroyo, 1998).

2.14.2 Adsorción

La adsorción física es considerada como el método más simple para la inmovilización ya que involucra interacciones superficiales reversibles entre la enzima y el material de soporte (Fig. 11). La fijación es llevada a cabo por puentes de hidrógeno, “enlaces salinos” y fuerzas de Van der Waals, sin reactivos adicionales y en condiciones moderadas. Es económico y permite preservar la actividad y especificidad enzimática, considerando que las características que determinan la cantidad de la enzima así como su comportamiento después de la inmovilización son la composición del acarreador, el radio molar de los hidrofílicos a hidrofóbicos, el tamaño de la partícula y la superficie disponible. (Stoytcheva, et al. S/A; Yong y Al-Duri, 1996; Fernandez-Lafuente et al. 1998; Rangel, et al. 2011).

Li et al. (2009) presentó una lipasa inmovilizada de *Penicillium expansum* que se observa que mostró eficiencia como biocatalizador para producción de biodiesel de aceite vegetal residual con un nivel elevado de acidez en solvente orgánico. Se observó que tanto el metanol como el agua proveniente de la reacción impedían el rendimiento ideal de la reacción, sin embargo también se mostró que los adsorbentes podían efectivamente controlar la concentración de agua, al utilizar silica gel, se determinó como adsorbente óptimo permitiendo un rendimiento de 92.8% en 7 h permaneciendo con 68.4% de la actividad enzimática tras ser reutilizada en 10 corridas.

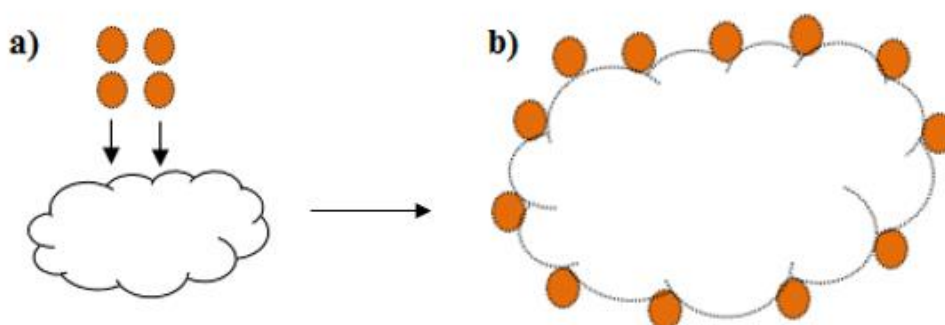


Fig. 11 Inmovilización por adsorción. a) Enzima y soporte b) Mecanismo de interacción.

2.14.3 Atrapamiento y/o encapsulación

Este procedimiento involucra la captura de la enzima dentro de una matriz de polímero (Cao, 2005; Serralheiro et al. 1990; Vicente et al. 1994) en el que la enzima permanece atrapada en un gel y puede ser encapsulada posteriormente. Ambos procedimientos requieren de equipos sencillos y reactivos relativamente baratos.

Se reporta que aquellas enzimas inmovilizadas por atrapamiento y/o encapsulación son más estables que las adsorbidas físicamente, por este método también mantienen su actividad y especificidad y son más fáciles de recuperar que aquellas inmovilizadas por adsorción; presentando niveles promedio de conversión del 65%. (Stoytcheva et al. S/A; Meter et al. 2007; Jegannathan et al. 2008).

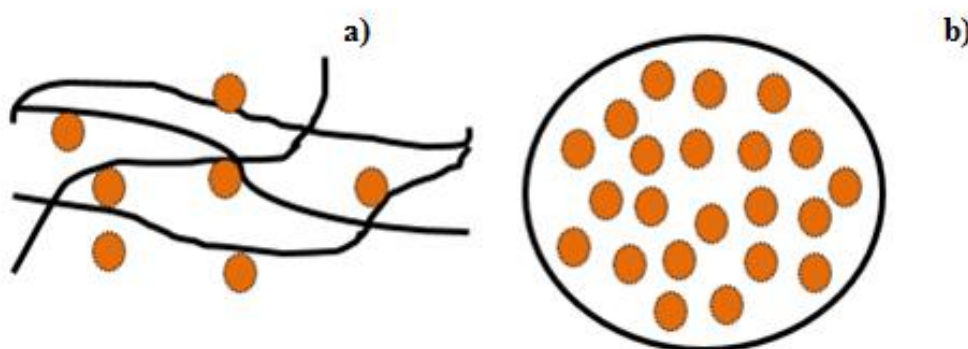


Fig. 12 Inmovilización por a) Atrapamiento, b) Encapsulación.

2.14.4 Inmovilización por enlace covalente

Este procedimiento es el resultado de una reacción química entre los residuos activos de los aminoácidos exteriores al sitio catalítico y el sitio de unión de la enzima y los activos funcionales del acarreador (Fig. 13) (Cao, 2005). Es la técnica más eficiente para la inmovilización y permite que las lipasas sean reutilizadas (Hwan Lee et al. 2006). Una ventaja de estos métodos, es la estabilidad entre los enlaces formados por la enzima y la matriz, (Matiasson and Kaul, 1991) por lo que son utilizados cuando se tiene un requerimiento estricto en la ausencia de enzima en el producto. Los principios básicos que controlan el trayecto de los enlaces covalentes a las matrices son análogos a aquellos usados para la modificación química de proteínas. Siendo las más frecuentes

aquellas que incluyen aminoácidos que presentan grupos ϵ -amino, grupo tiol y grupo carboxílico (Brena and Batista, S/A).

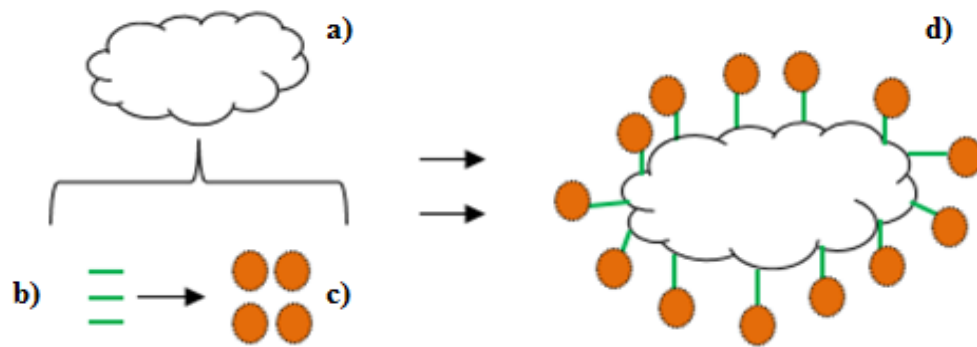


Fig. 13. Inmovilización por enlaces covalentes. a) Soporte, b) Enlace covalente, c) Enzima, d) Interacción del sistema de inmovilización.

3. Justificación

La diversificación hacia fuentes de energía renovables (eólica, nuclear, geotérmica, biomasa, etc.) se ha convertido en una necesidad palpable que debe ser atendida. La utilización del conjunto de estrategias que conforman a la energía “verde” presenta una opción prometedora que conlleva sus retos particulares.

El biodiesel particularmente presenta numerosas ventajas; puede ser utilizado en motores de combustión interna sin modificaciones significativas, ha sido catalogado por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (EPA) como un combustible limpio y a través de su uso permite reducir entre un 40%-80% las emisiones de CO₂ a la atmósfera, es libre de azufre y su uso disminuye la concentración de partículas en suspensión y metales pesados; sin embargo dichos beneficios se ven opacados por su alto costo de producción y su baja competitividad en el mercado, en gran medida debido al alto costo de la materia prima para su producción, que, en su mayoría parte de aceites vegetales puros extraídos de fuentes alimenticias como la soya, canola, jatrofa, y palma de aceite, entre otros, y que dependiendo del rendimiento por hectárea de aceite extraído y del potencial de utilización que presenta el residuo final del cultivo, pueden aumentar el costo de producción del biocombustible.

Ya que el método tradicional de producción de biodiesel es la transesterificación química en la que se utilizan catalizadores alcalinos como el NaOH y el KOH, encontramos un punto clave para la diversificación de producción a través la utilización de catalizadores biológicos (lipasas) ya que el uso de estos reduce la cantidad de lavados de las muestras de biodiesel y evita la generación de residuos de agua con contenido de sales.

Son las propuesta de este proyecto el producir biodiesel siguiendo 2 estrategias: 1) utilizando aceite vegetal residual como materia prima a través de transesterificación con catalizadores químicos, su optimización y determinación de rangos de trabajo con muestras con altos contenido de ácidos grasos libres (>1%). 2) Mediante la utilización de catalizadores biológicos, específicamente lipasas, obtener biodiesel promoviendo una reacción más amigable al ambiente eliminando una fuente importante de contaminación al agua y a su vez permitiendo que los costos de producción disminuyan ya que el proceso se realiza en menos etapas lo que significa una reducción en energía y menor cantidad de agua para lavados.

4. Hipótesis

El uso de catalizadores biológicos presentará una alternativa viable en comparación con catalizadores químicos para la producción de biodiesel por medio del proceso de transesterificación.

5. Objetivo general

Analizar el efecto del uso de catalizadores químicos y biológicos en la transesterificación de triglicéridos a partir de aceite comestible residual.

5.1 Objetivos particulares

1. Obtención de biodiesel por medio de reacción de transesterificación alcalina utilizando hidróxido de sodio e hidróxido de potasio.
2. Determinar las condiciones de temperatura, tiempo de agitación, concentración de catalizador y proporción alcohol/aceite para realizar la transesterificación alcalina.
3. Determinación de calidad del biodiesel producido.
4. Aislar cultivos bacterianos y fúngicos para obtención de células secas y sobrenadantes tanto libres, inmovilizados y liofilizados para ser probados como potencial biocatalizador.
5. Evaluar la actividad enzimática de los microorganismos aislados (lipasas) por métodos cualitativos y semi-cuantitativos.
6. Determinación cuantitativa de actividad lipolítica por medio de espectrofotometría utilizando p-nitrofenil palmitato.
7. Obtención de biodiesel por medio de transesterificación enzimática.

6. Materiales y métodos

6.1 Obtención de muestras de aceite

Se realizaron convenios con 3 empresas de la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León para la obtención de muestras de aceite residual (Fig. 14) tomando en cuenta su tiempo de utilización y fuente de obtención. Las muestras, de 3 a 5 L fueron colectadas mensualmente por un periodo de 6 meses.



Fig. 14 Muestras obtenidas de empresas restauranteras

6.2 Filtración

Se calentó el aceite a 35 °C para remover impurezas propias de la muestra (restos de alimentos) a través de malla de colador (Fig. 15).



Fig. 15 Impurezas retiradas de muestras de aceites.

6.3 Remoción de agua

Se aplicó calor al aceite por medio de base de calentamiento tomando la temperatura con un termómetro, gradualmente aumentando hasta 100 °C para eliminar el agua presente en la muestra, llegando a esta temperatura sin agitación; se continuó

aumentando la temperatura a 130 °C agregando agitación constante por 10 minutos para asegurar que se eliminó la totalidad del agua. Las muestras de aceite fueron colocadas en contenedores plásticos y almacenadas a temperatura ambiente (25 °C).

6.4 Determinación de ácidos grasos libres expresado en % de ácido oleico y Nivel de acidez (titulación)¹

El % de ácidos grasos libres o por sus siglas en inglés, *free fatty acids* %, (%FFA) fue determinado en base al método de la AOAC 940.28 para aceites crudos y refinados.

Por la naturaleza de la muestra, se utilizó la metodología establecida para aceites refinados, donde se pesó 1 g de muestra que fue mezclado en un matraz de 250 mL con 10 mL de alcohol isopropílico y 2 mL de fenolftaleína. Esta solución fue calentada y homogenizada.

La solución tritrante fue NaOH a una concentración de 1 M que fue agregado por medio de bureta graduada midiendo cuidadosamente las cantidades de la solución hasta observar un cambio de color a rosa (estable por al menos 10 segundos) reportando como % de ácido oleico, lo cual nos indica un pH de 8-9 (Sudhir, et al., 2007)



Fig. 16 Determinación de acidez en aceites¹

¹Este paso es necesario para determinar la cantidad de catalizador que se necesitará para completar el proceso de transesterificación.

6.5 Determinación de perfil de ácidos grasos

El análisis de la muestra de aceite se realizó mediante el método AOAC 969.33.

6.6 Determinación de peso molecular de aceite

$$\text{Peso molecular de ácido graso (PMi)} = 14.027c - 2.016d + 31.9988$$

c= carbonos, **d**= número de insaturaciones.

$$\text{Peso molecular de total de ácidos grasos (PMAG)} = \frac{\sum fi}{\sum (\frac{fi}{PMi})}$$

fi= fracción del peso de ácido graso, $\sum fi$ = sumatoria de ácidos grasos presentes en la muestra, **PWi**= peso molecular ácido graso.

El peso molecular de la muestra se determina dividiendo la suma de los pesos de los ácidos grasos reportados por el total de moles en la mezcla.

$$\text{Peso molecular de total de ácidos grasos (PMAG)} = \frac{\sum fi}{\sum (\frac{fi}{PMi})}$$

$$\text{Peso molecular de aceite} = 3 \times \text{PMAG} + 38.049$$

38.049= Peso de glicerol presente en la molécula de triglicérido.

6.7 Transesterificación química

La reacción de transesterificación se llevó a cabo entre 3 elementos: aceite, un alcohol de bajo peso molecular (metanol) y un catalizador. Químicamente, el mecanismo de transesterificación consiste en 3 reacciones consecutivas reversibles, el triglicérido es convertido consecutivamente en diglicérido, monoglicérido y glicerol liberándose un mol de éster metílico (Crespo et al., 2001).

6.7.1 Determinación de relación molar alcohol:aceite

De acuerdo a la estequiometría de la transesterificación, para obtener el producto deseado (metil esteres) se requiere un mínimo de 3 moles de alcohol por cada mol de

aceite, una relación de 3:1; para realizar la determinación experimental de ésta, se definió utilizando el peso molecular del alcohol de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Moles de metanol: mol de aceite} \times \text{relación molar} \frac{\text{metanol}}{\text{aceite}}$$

$$\text{Gramos de metanol: mol de metanol} \times \text{PM metanol}$$

6.7.2 Ajuste de catalizador en base a % de ácidos grasos libres

Se tomó el valor obtenido en mililitros derivado de la titulación del aceite, en base a la siguiente fórmula.

$$\text{Peso Catalizador} = \frac{\% \text{ acidez} \times \text{PM Catalizador} \times \text{g. de muestra}}{100 \times \text{PM ácido graso predominante}}$$

% de Acidez= determinado por método AOAC 940.28.

6.7.3 Cantidad de catalizador necesario con respecto al peso del aceite.

La cantidad de catalizador fue variable dependiendo del porcentaje que se utilizó considerando la neutralización de ácidos grasos libres.

$$\text{g de KOH} = \frac{\text{g de aceite} \times \% \text{ catalizador}}{100}$$

6.7.4 Cantidad de aceite

Se utilizaron muestras de 100 g de aceite vegetal residual de cada una de las 3 empresas trabajadas equivalentes a 113 mL.

6.7.5 Preparación de metóxido

Se realizó la mezcla de metanol con el catalizador correspondiente, (NaOH, KOH) disolviendo con agitación constante y aplicación de calor moderado. Se recomienda utilizar una cubierta de papel aluminio para evitar la evaporación del metanol e hidratación del catalizador. El metóxido, una vez disuelto y atemperado (60 °C) se

agregó a la muestra de aceite para proceder con un proceso de agitación constante a tiempos de 60 y 90 minutos.

6.7.6 Recuperación de biodiesel

Se permitió que las muestras se asentaran en 2 fases (Fig. 17) por lo menos 24 h antes de realizar la decantación en embudo de separación, conservando por separado el glicerol obtenido de la reacción.

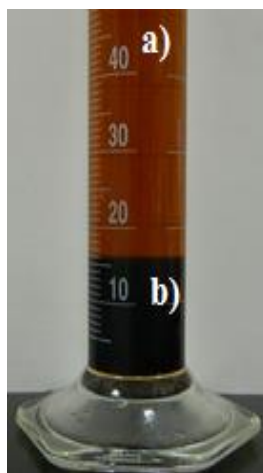


Fig. 17 Muestra de biodiesel. a) Biodiesel, b) Glicerol.

6.7.7 Pre tratamiento ácido

Solamente para la empresa 3 se empleó un pre-tratamiento de esterificación con ácido sulfúrico, se calentó el aceite a 60°C añadiendo 50-60% del metóxido preparado para cada reacción a realizar. Se agregó la cantidad necesaria de ácido sulfúrico derivada de la determinación previa de acidez, se mezcló por 30 min para dejar reposar *overnight*. Se re-determinó el índice de acidez tomando la metodología descrita previamente (Sudhir, et. al., 2007).

6.7.8 Lavado de biodiesel

Una vez retirado el glicerol se realizaron un mínimo de 3 lavados por medio de la técnica de agitación (*Shaking*) agregando 30 mL de agua con 5 mL ácido acético. La mezcla se agitó por 5 minutos y se dejó asentar por 1 h para desechar el agua con los restos de jabones y reactivos que pudieran permanecer en la muestra de biodiesel.

Adicionalmente se trabajó la técnica de lavado por burbujeo (*Bubbling*) utilizando una bomba de aireación D-200 BOYU® (Fig. 18) con una salida de 2 L/min y una presión de 0.010mpa. Se colocó una manguera con una piedra de aireación al final para

permitir el paso de burbujas de aire por el cuerpo de la muestra por un tiempo de 60 minutos con 60 minutos de reposo.



Fig. 18 a) Bomba de aire, b) manguera y piedra de aireación.

6.8 Diseño experimental

Se evaluaron 6 variables (tipo y concentración de catalizador (CC), relación molar (RM), tiempo de agitación, temperatura (°C) y velocidad de reacción (rpm) y sus respectivas combinaciones. Se estableció la temperatura en 60 °C, la velocidad en 500 rpm, con 3 concentraciones de catalizador 0.5%, 1% y 1.5%, y 4 relaciones molares, 6:1, 10:1, 15:1 y 20:1. Se estableció un total de 24 reacciones por aceite por catalizador (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental Químico

No. Prueba	CC	RM	Tiempo de Rx. (min)	No. Prueba	CC	RM	Tiempo de Rx. (min)	RPM	Temp. (°C)
1	0.5	6:1	60	13	1.5	15:1	60	500	60 °C
2		6:1	90	14		15:1	90		
3		10:1	60	15		20:1	60		
4		10:1	90	16		20:1	90		
5		15:1	60	17		6:1	60		
6		15:1	90	18		6:1	90		
7		20:1	60	19		10:1	60		
8		20:1	90	20		10:1	90		
9		6:1	60	21		15:1	60		
10		6:1	90	22		15:1	90		
11		10:1	60	23		20:1	60		
12		10:1	90	24		20:1	90		

6.9 Pruebas de calidad

Se realizaron 11 pruebas de calidad bajo los criterios de las normas internacionales de la ASTM para biodiesel en proporción B20 (10% biodiesel-80% diésel) y B100 (biodiesel puro). Además se determinaron parámetros cualitativos como color y apariencia (sedimentos y/o precipitados).

Adicionalmente se realizó la prueba de conversión, también conocida como “27/3”; a menudo utilizada por productores de biodiesel a menor escala basándose en el principio de la miscibilidad del biodiesel en el metanol (Parker, S.K.). Si bien no se recomiendan como una prueba definitiva, se puede utilizar para complementar un análisis más profundo. Las pruebas de calidad se determinaron inmediatamente después del lavado de las muestras a los 4 meses y adicionalmente a los 12 meses de almacenamiento de las muestras.

Tabla 3. Pruebas de calidad

	Método de prueba	Límites	Unidades
Agua y sedimento	ASTM D 1796	Max. 0.05	(vol %)
Viscosidad cinemática 40 °C	ASTM D445	1.9-6.0	mm ² /s
Densidad a 15 °C	ASTM D 1298	0.875-0.900	g/cm ³
Punto de chispa (Flash point) (closed cup)	ISO CD 3679	Min. 130	°C
Punto de ignición		+ 15 a 20	
Punto de nube (Cloud point)	ASTM D 2500	NA	°C
Punto de vertido (Pour point)	ASTM 97	NA	°C
Índice de acidez total (Total Acid number)	ASTM D 664	Máx. 0.8	mg KOH/g
pH	ASTM 6423	6-8	
Conversión ¹	27/3	1 fase clara	
Apariencia y color	Small scale production	Amarillo-Café	

¹= Prueba complementaria a FTIR.

6.10 Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier

Se obtuvo confirmación de la composición de las muestras de biodiesel obtenidas mediante análisis de FTIR utilizando espectrómetro de infrarrojo Nicolet TM iS 10 con un rango de 400 to 4000 cm^{-1} .

Cada muestra tuvo 2 réplicas y fue cargada colocando una gota mediante la técnica de reflexión total atenuada siendo limpiada utilizando un paño con solvente.

Todos los espectros fueron normalizados para eliminar las diferencias en intensidad derivadas de las variaciones en la concentración.

6.11 Selección de sitio y toma de muestras

El sitio seleccionado para la toma de muestras fue dentro del Ejido 8 de Enero perteneciente al municipio de Frontera, Coahuila. En esta zona existen negocios que cuentan con preparación de alimentos al aire libre por lo que por el manejo y disposición de residuos la zona se encuentra afectada por una mezcla de diferentes aceites vegetales. Tomando en cuenta las características del lugar y de la irregularidad de zonas impactadas se decidió realizar un muestreo en línea recta (10 km) con sub-muestreos cada 2 km. Las muestras se tomaron con una pala de jardinería limpia y seca a una profundidad de entre 5-10 cm de profundidad. Fueron colocadas en bolsas de plástico nuevas (Fig. 19) y transportadas al laboratorio para ser conservadas a temperatura ambiente (25 °C).



Fig. 19 Muestras de suelo

6.12 Obtención de microorganismos de muestras de suelo

Una vez tamizadas las muestras, se partió de 1 g de suelo que fue procesado a través de dilución seriada (1×10^{-1} - 1×10^{-10}) para ser inoculados en 3 medios de cultivo diferentes para el aislamiento de diferentes microorganismos.

- Hongos: Agar papa dextrosa (*Potato Dextrose Agar/PDA*).
- Hongos: Agar Papa Dextrosa adicionado con Cloranfenicol (PDAC) al 1%.
- Bacterias: Agar Nutritivo (AN).

Los medio para hongos se incubaron por 21 días a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ mientras que el medio seleccionado para bacterias se incubó por 7 días a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ya obtenido el crecimiento se analizó la morfología colonial considerando: forma, textura, consistencia y pigmentación.

Asimismo se trabajaron muestras de 10 g de suelo representativas de cada sub-muestreo que fueron inoculadas en 100 mL de caldo nutritivo (Fig. 20) adicionado al 1% con inductores para producción de enzimas lipolíticas:

- Aceite vegetal residual.
- Aceite de oliva.
- Aceite de canola.

Se colocaron en agitación constante por 96 h a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm para posteriormente ser procesados por medio de dilución seriada para ser re-inoculados en los medios de cultivo sólidos antes mencionados para selección de cepas.



Fig. 20 Cultivos en líquido con a) aceite vegetal como inductor

6.13 Evaluación cualitativa y semi-cuantitativa de actividad lipolítica para selección de cepas

Una vez obtenidos los cultivos puros, tanto bacterianos como fúngicos, se evaluó de forma cualitativa su actividad lipolítica mediante la observación de fluorescencia de color naranja bajo luz UV a 350 nm utilizando Agar Rodamina B (ARB) al 0.002% con un tiempo de incubación de 96 h y revisión periódica cada 24 h con observación bajo luz UV.

Ya derivadas las cepas en cultivo puro, para hongos; se permitió su crecimiento por 21 días en placa con PDA para continuar con la preparación de solución de esporas:

- Se realizó el raspado de cajas utilizando asa bacteriológica estéril, colocando el producto del raspado en tubos con solución de Tween 80 al 0.001% ajustada a una concentración de 1×10^{-6} esporas/ml (inóculo).
- Se colocaron círculos de papel filtro estéril en el centro de las placas con agar rodamina B al 0.02%.
- Se procedió a añadir 2 ul de solución de inóculo.

Para cultivos bacterianos:

- Se perforaron pocillos de 3 mm de diámetro en forma horizontal en placas de agar rodamina B al 0.02% (Fig. 21).
- Se realizó un pre-cultivo de las cepas de 24 h.
- La concentración del inóculo se ajustó a 1 en la escala de McFarland.
- Se inocularon 10 ul de sobrenadante crudo en cada pocillo.

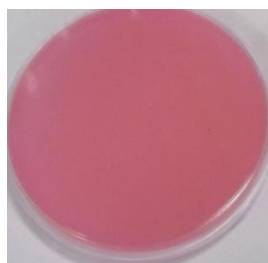


Fig. 21 Caja con Agar Rodamina B

Ambas técnicas tuvieron revisiones periódicas cada 24 h, para hongos se determinó un tiempo de medición de 144 h, mientras que para cultivos bacterianos se determinó un tiempo medición de 48 h.

6.14 Análisis preliminar para cuantificación enzimática

Se realizó una fermentación preliminar a pH 7 en caldo nutritivo (bacterias) y medio basal (hongos); ambos adicionados con 1% de aceite de oliva.

- De las cepas obtenidas del aislamiento directo de suelo y aislamiento con inducción se seleccionaron 5 cepas bacterianas en base al mayor tamaño de halo (Hou y Johnston, 1992).
- De las cepas obtenidas del aislamiento directo de suelo y aislamiento con inducción se seleccionaron 5 cepas fúngicas con mayor capacidad de crecimiento y esporulación (Carissimi et al. 2007).

6.15 Obtención del paquete celular y sobrenadante

Se ajustaron inóculos bacterianos y fúngicos para siembra en caldo nutritivo y medio basal:

- 120 h para bacterias con pre cultivo en placa por 24 h
- 168 h para hongos. Ajuste a 1×10^{-6} esporas/ml

Se tomó el 10% de cultivo que fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue probado para búsqueda de lipasas extracelulares. Se conservó el paquete celular a -20°C y 4°C.

6.15.1 Liofilización de sobrenadantes

Una vez obtenido el extracto crudo libre del paquete celular (producto de centrifugación) se colocó en viales de vidrio de 6 ml a un 60% de su capacidad total. Se sometieron a un proceso de congelación rápida al ser sumergidos en etanol absoluto y posteriormente llevados a -80 ° C para su almacenamiento por 24 horas. Se liofilizaron en una liofilizadora LABCONO® Freezone 18 con *stuppering dryer* a -40 °C y 133×10^{-3} milibares por 24 horas.

6.15.2 Secado de paquete celular

Una vez obtenido el paquete celular tanto bacteriano como fúngico, fue enjuagado con agua destilada estéril y centrifugado a 10,000 rpm, 4 °C y 10 minutos para posteriormente drenarse y permitir su secado por “*air drying*” a una temperatura de 37 °C por 48 horas.

6.16 Curva estándar nitrofenol

Se colocaron 0.05 a 0.5 ml de una solución de p-nitrofenol al 0.5 mM en tubos de ensayo para diluir a 5 mL con Tris HCl al 0.1, pH 8.2. Se construyó una curva estándar (Fig. 22) midiendo la absorbancia a 410 nm utilizando como blanco Tris HCl (Pinsirodom and Parkin, 2001).

6.17 Ensayo para cuantificación de actividad lipolítica

Del sobrenadante obtenido se tomaron 500 mL que fueron mezclados con una solución de 1.25 mL de Tris HCl 0.1 M y 1.25 mL de p-nitrofenil palmitato 420 uM. Se utilizó agua como blanco; como control positivo una cepa de *Bacillus subtilis* y extracto crudo desactivado como control negativo. Posteriormente se hicieron lecturas de cada muestra (x3) a 410 nm cada minuto por 15 minutos.

Se utilizó la curva estándar de p-nitrofenol para convertir las absorbancias a mM de sustrato hidrolizado: $\mu\text{mol } p\text{-nitrophenol/ml reaction mixture} = (A_{410} - \text{y intercept})/(\text{pendiente} \times 3 \text{ ml reaction mixture})$.

Se determinaron las Unidades Internacionales por Litro utilizando la siguiente fórmula

$$AL(\text{IU/L}) = \frac{\Delta\text{Abs/ min} * VT * 1000}{17.91 * LP * VM}$$

$\Delta\text{abs/min}$ = cambio en la absorbancia por minuto.

VT= volumen total de reacción en mL.

1000= factor de conversión para Litros.

17.91= coeficiente de extinción de p-nitrofenol.

VM= volumen de muestra.

6.17.1 Ajuste de pH

En base a literatura se eligieron condiciones de temperatura y rpm óptimas con enriquecimiento al 1% de aceite de oliva en medio base para cultivos bacterianos y fúngicos.

- Se ajustó el pH a 7, 8 y 9
- Se tomaron muestras del 10% del volumen total cada 24 horas.
- Se conservó el sobrenadante para búsqueda de lipasas extracelulares y paquete celular para lipasas intracelulares.

6.18 Selección de biocatalizador

Una vez que se determinó la actividad lipolítica de cepas de microorganismos aislados se decidió continuar solamente con el uso de las cepas bacterianas en base a lo resultados obtenidos.

6.18.1 Extracción de DNA

Se realizó una extracción estándar utilizando paquete celular seco. Una vez obtenido el crecimiento del microorganismo se transfirió a un tubo Falcon® para ser centrifugado y desechado el medio de cultivo. Se virtió nitrógeno líquido en un mortero estéril, posteriormente se colocó la pastilla celular y se congeló con nitrógeno líquido para ser pulverizado. Se agregaron 3 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 50mM, pH 7.5, EDTA 20mM y SDS 1%) a la pastilla celular. Una vez colocados en tubos Eppendorf® con 1 ml se añadieron 200 μ l de acetato de potasio 5M y 150 μ l de NaCl 5 M, se mezcló en vórtex y se incubó en hielo por 20 min. Se prosiguió con una centrifugación a 15,000 rpm por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo con 200 μ l de fenol-cloroformo-alsohol isoamílico (25:24:1) se mezcló y se conservó a -80 °C por min. Se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se recuperó la fase superior. Considerando el volumen de la muestra se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó por 30 min a -20 °C. Se centrifugaron los tubos a 15,000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó y lavó la pastilla de DNA con 1 ml de etanol al 70%. Se decantó nuevamente

y evaporó el etanol restante. Finalmente se disolvió el precipitado en 50 µl de buffer TE 1X. Seguido de una reacción de PCR utilizando los *primers* de las regiones ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') para hongos y 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') y 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') para bacterias.

6.18.2 Identificación molecular

Una vez obtenida la información de la secuenciación de cepas se realizaron los siguientes análisis bioinformáticos. Los archivos en formato ABI donde se muestran los electroferogramas fueron visualizados en el programa Chromas lite v2.1.1 (Technelysium) donde se obtuvieron las secuencias sentido y anti-sentido en formato FASTA de cada uno de los aislados, seguido de esto se analizaron las secuencias de cada aislado en el programa computacional Clustal W (Larkin et al. 2008), para obtener una secuencia consenso de cada organismo.

Posteriormente cada secuencia se alineó en el programa de alineamientos locales BLAST (Lobo, 2008) y en el programa RDP (Ribosomal Database Project) (Cole et al. 2011), donde se buscaron las similitudes de secuencias comparadas con las bases de datos. Una vez determinados los organismos se procedió a descargar secuencias de la base de datos GenBank, para el posterior análisis múltiple de secuencia donde se compararon las muestras de nuestro estudio con las reportadas y así poder comprobar los géneros de cada muestra.

Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de *Neighbor Joining*, construyendo los árboles filogenéticos en el programa computacional MEGA6 (Tamura et al. 2013) y visualizándolos en el programa computacional en línea iTOL (Letunic y Bork, 2007).

6.19 Inmovilización de extracto enzimático crudo

Se preparó una solución de alginato de sodio al 3% adicionando lentamente 3 gramos de alginato a 100 ml de agua destilada tibia en agitación. Una vez obtenida una mezcla uniforme y sin “grumos” se agregó el extracto crudo enzimático en proporción 1:1, el cual fue cargado en un jeringa y vertido gota a gota en una solución de cloruro de

calcio al 0.2 M desde una distancia de 20 cm de altura. Se permitió el reposo de las “perlas” en solución por 60 minutos.

Pasado este tiempo se retiraron de la solución de cloruro de calcio y fueron almacenadas a 4°C.

6.20 Transesterificación enzimática

Se realizó en frascos de 50 ml utilizando 10 ml de aceite vegetal virgen (control) y aceite vegetal residual con 10%-50% en base a peso de sobrenadante inmovilizado en perlas de alginato, una razón de aceite vegetal reutilizado y metanol de 10:1 en un rango de temperaturas de 25° a 60 °C con 2 estrategias de adición de metanol; en adición única y escalonada cada 24 horas, todos los ensayos realizados a una velocidad constante de 250 rpm.

6.21 Equipo utilizado

Campana de flujo laminar (Labconco© Corp. Bioseguridad II), Placa de calentamiento con agitación magnética (Thermolyne Cimarec 3), Potenciómetro (Beckman Instruments™ 390), Balanza semi-analítica (Mettler Toledo© International Inc. PG4402-S), Balanza analítica (Mettler Toledo© International Inc. AB204), Incubadora (Thermo Scientific Precision™), Vortex (MaxiMix* II vortex mixer Thermo Fisher Scientific© Inc. y VWR Minivortexer VWR® International), Autoclave (All American® pressure sterilizer 1925 X), Shaker rotatorio (New Brunswick Scientific© Co.), Congelador (Torrey®), Centrífuga Allegra (Beckman Coulter© Inc. 21R), Centrífuga (Beckman Coulter © Inc.J2-21)

6.22 Análisis estadístico de resultados

Los resultados obtenidos tanto para producción de biodiesel como actividad enzimática se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de $p < 0.05$ con una prueba post-Anova de Tukey por medio del programa estadístico SPSS versión 20.0.

7. Resultados y Discusión

7.1 Obtención de muestras de AVR

Se establecieron acuerdos de colaboración con 3 empresas del ramo restaurantero localizadas en la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. Las muestras se tomaron directamente de los contenedores de aceite para asegurar su procedencia como desecho.

Se obtuvieron mensualmente cantidades de 3-5 L de AVR por un periodo de 6 meses. Una vez libre de impurezas y agua se determinó su perfil de ácidos grasos y peso molecular (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos y peso molecular.

Ácido graso	Empresa 1 (E1)	Empresa 2 (E2)	Empresa 3 (E3)
Ácido láurico	0.11		
Ácido mirístico	0.71		0.82
Acido palmítico	11.61	13.16	34.76
Ácido palmitoléico	0.75	1.27	2.08
Ácido margárico	0.28		
Ácido margaroléico	0.25		
Ácido esteárico	5.47	4.73	5.16
Ácido oleico	52.65	30.92	44.52
Ácido linoleico	23.52	45.14	12.67
Ácido linolénico	2.24	4.78	
Ácido araquídico	0.36		
Ácido gadoléico	0.71		
Peso molecular	872.16	868.84	846.24

7.2 Determinación de porcentaje de ácidos grasos libres

Se retiraron las impurezas de las muestras de AVR y una vez libres de agua se procedió a determinar su porcentaje de ácidos grasos libres (Tabla 5). Este parámetro se expresó en base al porcentaje del ácido graso predominante en cada muestra. Generalmente se utiliza el ácido oleico, el cual coincidió para dos (Empresa 1 y Empresa 3) de las muestras trabajadas, mientras que para la empresa 2 se utilizó su correspondiente ácido graso predominante, el ácido linoleico (Índice de acidez, s.f.).

Tabla 5. Acidez en muestras de aceite vegetal residual

Muestra	Aceite Nuevo	Aceite Vegetal Residual
Empresa 1	0.01	8.79
Empresa 2	0.01	2.74
Empresa 3	0.05	7.22

Considerando la procedencia de las muestras de aceite se debe tomar en cuenta que las condiciones de temperatura, contenido de agua, tiempo y tipo de freído afectan algunas de las principales propiedades del aceite; la viscosidad aumenta debido a la formación de ácidos grasos diméricos y poliméricos, mientras que por la exposición al calor y al agua se acelera la hidrólisis de los triglicéridos aumentando el contenido de ácidos grasos libres (Rodriguez Machado et al. 2007; Cardona Alzate, 2009). La variación en los porcentajes de acidez puede ser explicada por las diferentes técnicas de procesamiento así como la calidad del aceite refinado, como podemos observar en la Tabla 5, se tomaron valores del aceite vegetal sin haber sido procesado (nuevo) obteniendo resultados dentro de los parámetros de calidad para las tres muestras no excediendo 0.06% de ácido oleico marcado por las normas mexicanas NMX-F-101 y NMX-F-223-1985. Mientras que al observar los porcentajes de acidez una vez que son retirados del proceso de cocción podemos observar un cambio drástico al obtener valores entre 2.74% AGL para la empresa uno, 7.22% AGL para la empresa tres y 8.79 % AGL para la empresa dos todas excediendo el porcentaje recomendado de %AGL lo que corrobora su estatus como aceite vegetal residual no recomendado para consumo (Tabla 6).

Tabla 6. Valores habituales de acidez libre de las materias grasas

Materia grasa refinada	Materia grasa refinada deteriorada	Soap stock acidulados
0.2%	0.5–1.5%	40–60%

7.3 Neutralización de AGL

Los valores de acidez, además de ser considerados para valorar si la grasa o aceite está en condiciones de desecho, se utilizan para determinar el tipo de tratamiento que debe dársele como materia prima para producción de biodiesel. De acuerdo con Kulkarni y Dalai (2006) si el contenido de ácidos grasos libres está por encima de 1% a 3% el uso de un pre-tratamiento es ampliamente recomendado para realizar el proceso de transesterificación; dentro de los cuales, la esterificación ácida es uno de los tratamientos de mayor elección para la conversión de ácidos grasos libres en ésteres, aún y cuando se han reportado pérdidas de muestra de hasta el 4% y formación de agua (Ahmad, et al. 2010; Van Gerpen, 2005; Kumar et al. 2007; Kombe et al.).

Otro método relevante para la neutralización de AGL en muestras que no cumplen con los parámetros de acidez recomendados para transesterificación directa, es la neutralización alcalina; si bien con esta técnica se puede llegar a perder hasta el 20% del volumen de la muestra, si se considera que la reacción es reversible y se realizan los cálculos exactos tomando en cuenta su parámetro de acidez podemos obtener una pérdida de muestra nula.

La utilización de la neutralización alcalina requiere el análisis del perfil de ácidos grasos y su posterior determinación de peso molecular ya que el exceso y/o falta de la cantidad de catalizador necesaria llevará la reacción a un estado de saponificación (Refaat, 2010).

Tomando la correlación directa que existe entre el porcentaje de AGL y la cantidad de catalizador que debe añadirse a la reacción para compensar su acidez y consecuente desactivación (Freedman et al. 1986), la neutralización alcalina fue elegida como principal técnica de neutralización para las muestras de las empresas trabajadas por su efectividad al reducir la pigmentación y bajar la cantidad de AGL (Bhosle y Subramanian 2005; Sudhir et al. 2007).

Este método de pre-tratamiento solo se encontró exitoso para dos (E1 y E2) de las tres empresas trabajadas, siendo necesario aplicar una esterificación ácida previa para las muestras de la empresa E3.

7.4 Transesterificación alcalina

Una vez obtenidas las muestras de aceites neutralizadas se llevó a cabo la transformación de ácidos grasos a metil ésteres por medio de un proceso de transesterificación.

Se utilizaron 2 catalizadores “clásicos”, iniciando la experimentación para la empresa E1 con NaOH (Fig. 22). Partiendo del diseño experimental se obtuvieron 5 reacciones positivas para producción de biodiesel (Tabla 7).

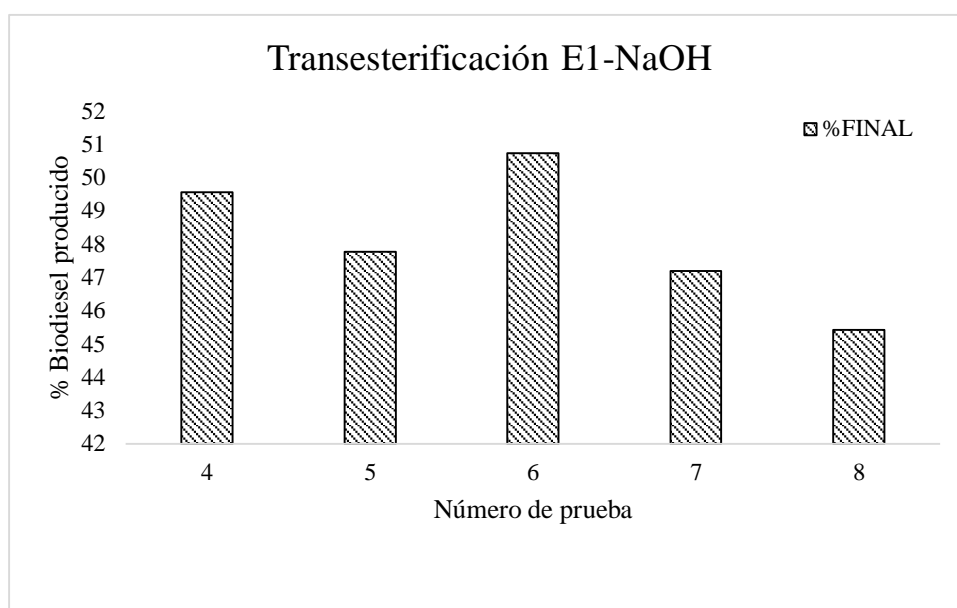


Fig. 22 Producción de Biodiesel E1-NaOH

Tabla 7. Condiciones de reacción E1-NaOH

No. Prueba	CC	RM	Tiempo de Rx. (min)	RPM	Temp. (°C)
4	0.5	10:1	90	500	60 °C
5		15:1	60		
6		15:1	90		
7		20:1	60		
8		20:1	90		

Utilizando la misma materia prima (E1) se probó el diseño experimental con KOH como catalizador, para el cual se obtuvieron 16 reacciones exitosas para producción de biodiesel (Fig. 23), de las cuales se eligieron las 5 con mejor rendimiento en volumen (Tabla 8).

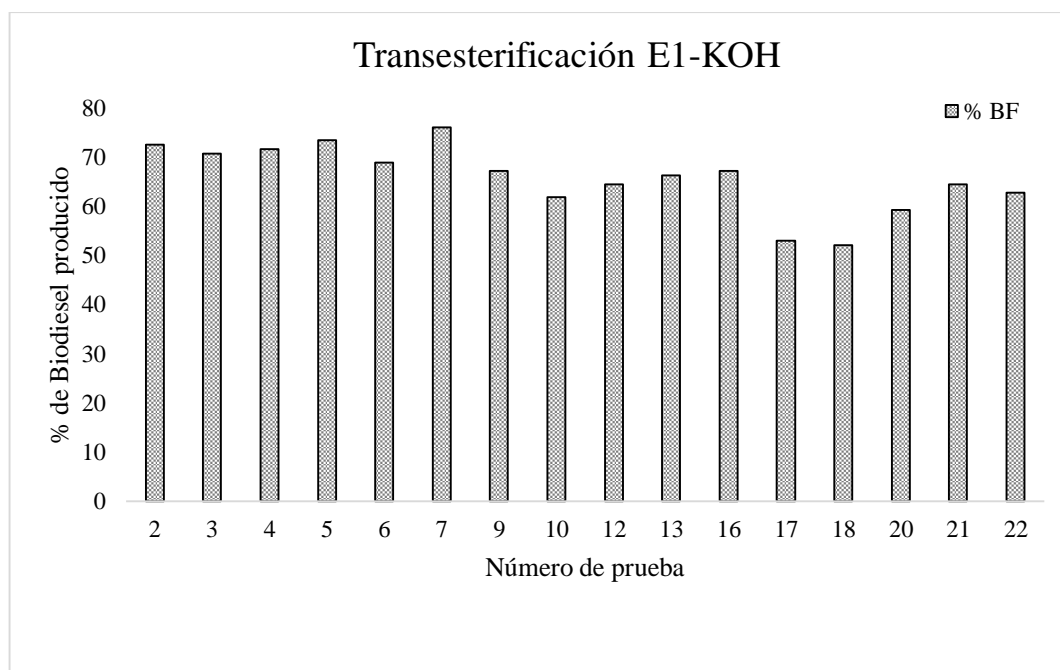


Fig. 23 Producción de biodiesel E1-KOH

Tabla 8. Condiciones de reacción E1-KOH

No. Prueba	CC	RM	Tiempo de Rx. (min)	RPM	Temp. (°C)
3	0.5	10:1	60	500	60 °C
6		15:1	90		
7		20:1	60		
8		20:1	90		
15	1	20:1	90		

Para la empresa E2 (Tabla 9) de igual manera se inició con NaOH como catalizador obteniendo 12 reacciones exitosas con un rango de producción entre 46-79.6% (Fig. 24), seleccionando las 5 reacciones con mayor rendimiento.

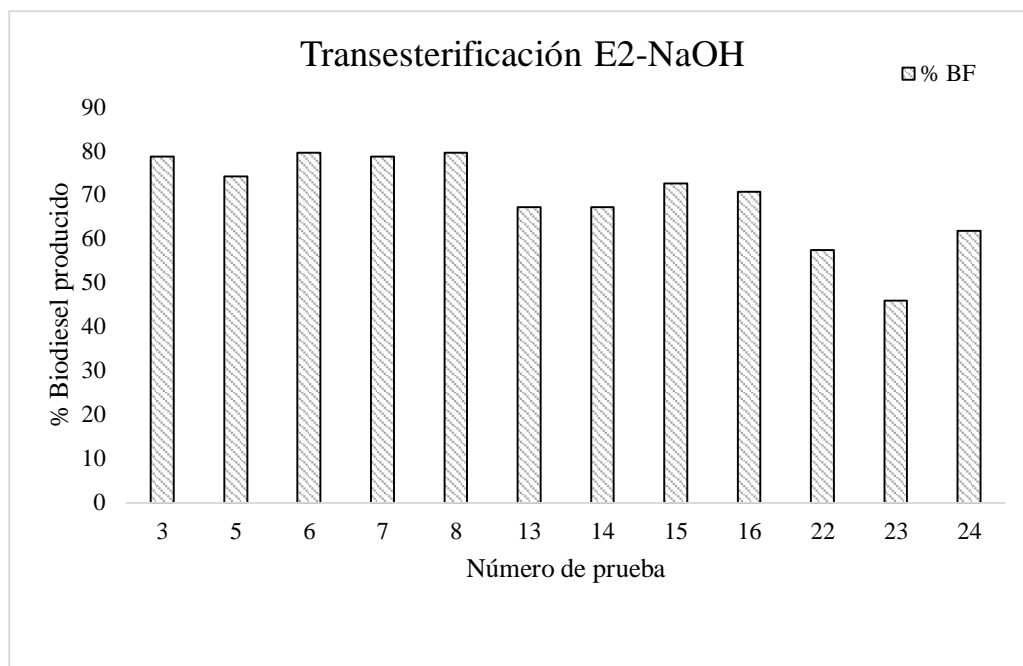


Fig. 24 Producción de biodiesel E2-NaOH

Tabla 9. Condiciones de reacción E2-NAOH

No. Prueba	CC	RM	Tiempo de Rx. (min)	RPM	Temp. (°C)
3	0.5	10:1	60	500	60 °C
4		10:1	90		
5		15:1	60		
6		15:1	90		
7		20:1	60		

Para la Empresa 2 (E2), se obtuvieron 14 reacciones exitosas utilizando KOH como catalizador (Fig.25) de las cuales también se seleccionaron las 5 con un mejor rendimiento en volumen (Tabla 10). Si bien el porcentaje de acidez se encontró que rebasaba los valores de aceptación de un aceite vegetal residual, el grado de insaturaciones que presenta en su composición creemos tuvo influencia en la transformación de ácidos grasos a metil ésteres.

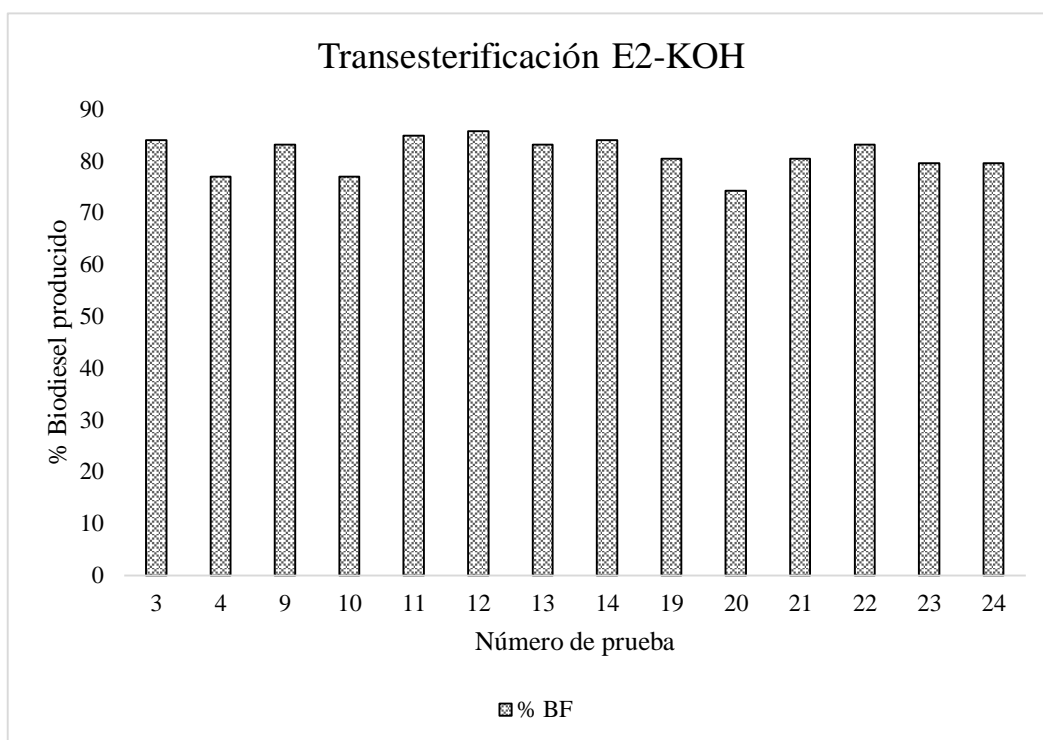


Fig. 25 Producción de biodiesel E2-KOH

Tabla 10. Condiciones de reacción E2-KOH

No. Prueba	CC	RM	Tiempo de Rx. (min)	RPM	Temp. (°C)
3	0.5	10:1	60	500	60 °C
4		10:1	90		
11		10:1	60		
12		10:1	90		
13	1	15:1	60		

Sin embargo para la empresa 3 (E3) este primer enfoque (neutralización alcalina) no fue exitoso mostrando reacciones de saponificación con ambos catalizadores (Fig. 26).



Fig. 26 Reacciones saponificadas

7.5 Pre- tratamiento ácido

Al no obtener resultados exitosos para producción de biodiesel a partir de la muestra E3 se consideró como un punto de suma importancia el análisis del perfil de ácidos grasos, observando que para esta muestra el porcentaje de ácidos grasos saturados fue de 40.74% (Tabla 11) en comparación con el 18.54% y el 17.89% encontrado en las empresas E1 y E2 respectivamente.

La composición y distribución de los ácidos grasos en la muestra (E3) nos ofrecen un indicio de que la fuente de obtención de dicho aceite es de origen animal y si bien, la utilización de grasas animales para producción de biodiesel le brinda características favorables al combustible producido al tener mayor estabilidad, cabe mencionar que en la actualidad la mayoría de los aceites vegetales presentan antioxidantes en su composición, lo que permite que se mantengan con un grado de estabilidad comparable al de las grasas animales aun conteniendo un mayor porcentaje de insaturaciones en su perfil de ácidos grasos (Van Gerpen, 2014).

Tabla 11. Porcentaje de saturación de muestras de aceite

Ácido graso	E1	E2	E3
Ácido láurico	0.11		
Ácido mirístico	0.71		0.82
Acido palmítico	11.61	13.16	34.76
Ácido palmitoléico	0.75	1.27	2.08
Ácido margárico	0.28		
Ácido margaroléico	0.25		
Ácido esteárico	5.47	4.73	5.16
Ácido oleico	52.65	30.92	44.52
Ácido linoleico	23.52	45.14	12.67
Ácido linolénico	2.24	4.78	
Ácido araquídico	0.36		
Ácido gadoléico	0.71		
Porcentaje de saturación (%)	18.54	17.89	40.74

Dado que la temperatura empleada en nuestro diseño se fijó en 60°C se consideró que por esta característica, la cantidad de AGL presentes y la viscosidad de la muestra, los aceites no fueron capaces de mezclarse de forma uniforme con el complejo alcohol-catalizador (metóxido) y por lo tanto no se obtuvieron resultados favorables de producción de biodiesel obteniendo productos de saponificación.

Tabla 12. Acidez Empresa tres (E3)

Muestra	Aceite Nuevo	AVR pre-esterificación (%)	AVR post-esterificación (%)
E3	0.05	7.22	2.73

Sin embargo al realizar el pre-tratamiento ácido (Fig. 27) se logró obtener una reducción de acidez en la muestra (Tabla 12) esterificando ácidos grasos libres lo que permitió su procesamiento por transesterificación alcalina obteniendo 4 reacciones positivas utilizando KOH como catalizador.

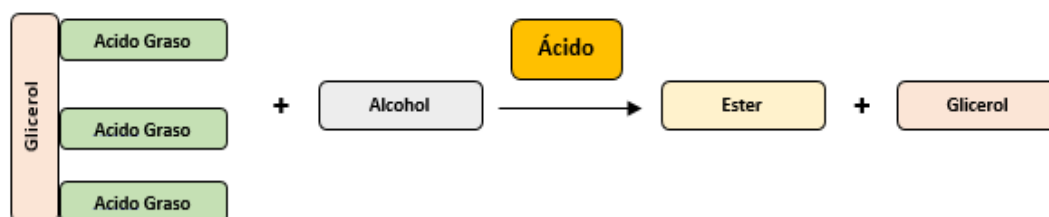


Fig. 27 Esterificación de ácidos grasos

Considerando el criterio fijado para las empresas E1 y E2 donde se tomaron las 5 reacciones con el mejor rendimiento y dado que para la empresa E3 se obtuvieron 4 reacciones positivas con producción de biodiesel (Fig. 28), se continuo con la totalidad de las muestras para evaluación de calidad.

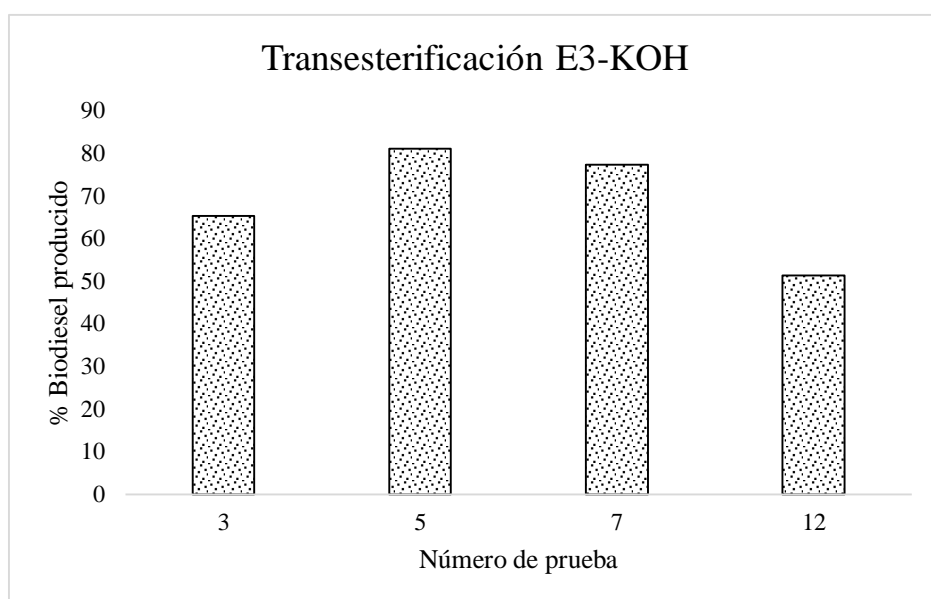


Fig. 28 Producción de biodiesel E3-KOH

7.6 Rendimiento de producción de biodiesel

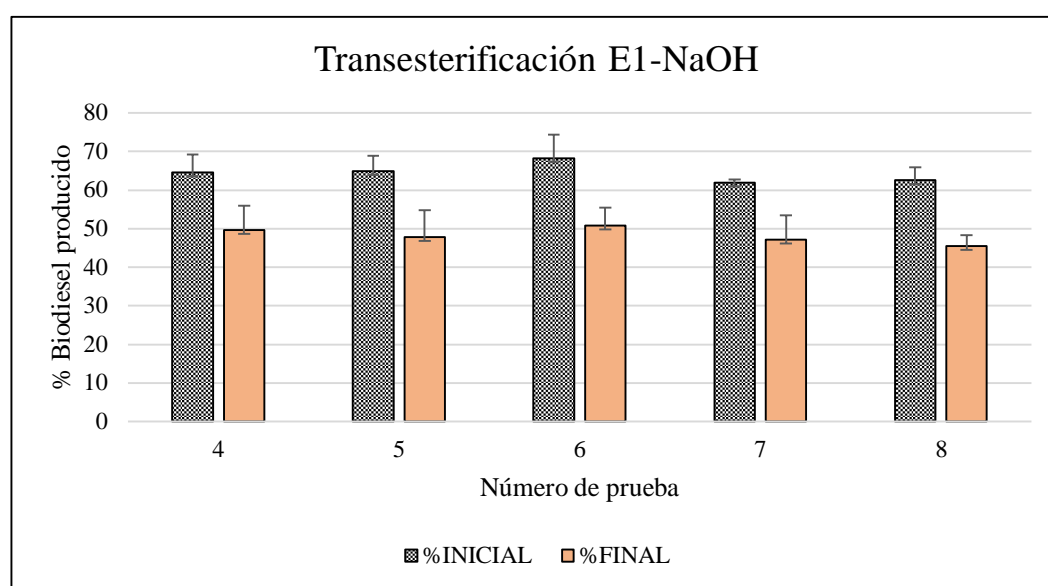
Se seleccionaron los rendimientos de producción finales al hacer la comparación entre reacciones de transesterificación con la finalidad de que el efecto de los lavados fuera considerado.

Se obtuvo producción de biodiesel a partir de las 3 muestras de aceites vegetales residuales proporcionadas por las empresas. De un *screening* primario que constó de la realización de 24 experimentos por catalizador para un total de 48 reacciones por empresa, en base a los resultados en rendimiento se seleccionó como catalizador óptimo al hidróxido de potasio.

Para la empresa E1 se iniciaron los tratamientos con NaOH (Tabla 13) como catalizador siguiendo las condiciones determinadas en el diseño experimental. Se obtuvieron resultados en un rango de 48 mL a 57.3 mL equivalentes al 42.5% y 50.7% respectivamente del volumen inicial de aceite empleado (Fig. 29).

Tabla 13. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E1-NaOH

Empresa E1-NaOH						
No. Prueba	BI (mL)	Glicerol	%inicial	BF (mL)	Perdida lavados	%Final
4	73	54	64.6	56.0±6.4	17	49.6
5	73.3	79	64.9	54.0±7.0	19.3	47.8
6	77	70.7	68.1	57.3±4.8	19.7	50.7
7	70	104	62.0	53.3±6.2	16.7	47.2
8	70.7	95.7	62.5	48.0±2.9	19.3	42.5

**Fig. 29** Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E1-NAOH

Para la empresa E1 utilizando KOH como catalizador (Tabla 14) se obtuvieron rangos de producción final de 71.7 mL a 75.0 mL equivalentes al 63.4% y 66.4% respectivamente, eligiendo a la reacción número 4 como la óptima en producción tomando en cuenta como factor importante la pérdida de muestra después de los lavados (Fig. 30).

Tabla 14. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E1-KOH

Empresa E1-KOH						
No. Prueba	BI (mL)	Glicerol	%Inicial	BF (mL)	Pérdida lavados (mL)	%Final
3	87.3	46.7	77.3	71.7±7.9	15.7	63.4
4	87.0	47.3	77.0	75.0±4.3	12.0	66.4
5	89.7	53.0	79.4	72.3±8.2	17.3	64.0
6	88.7	49.0	78.5	75.0±2.2	13.7	66.4
7	92.0	64.0	81.4	72.0±9.9	18.3	65.2

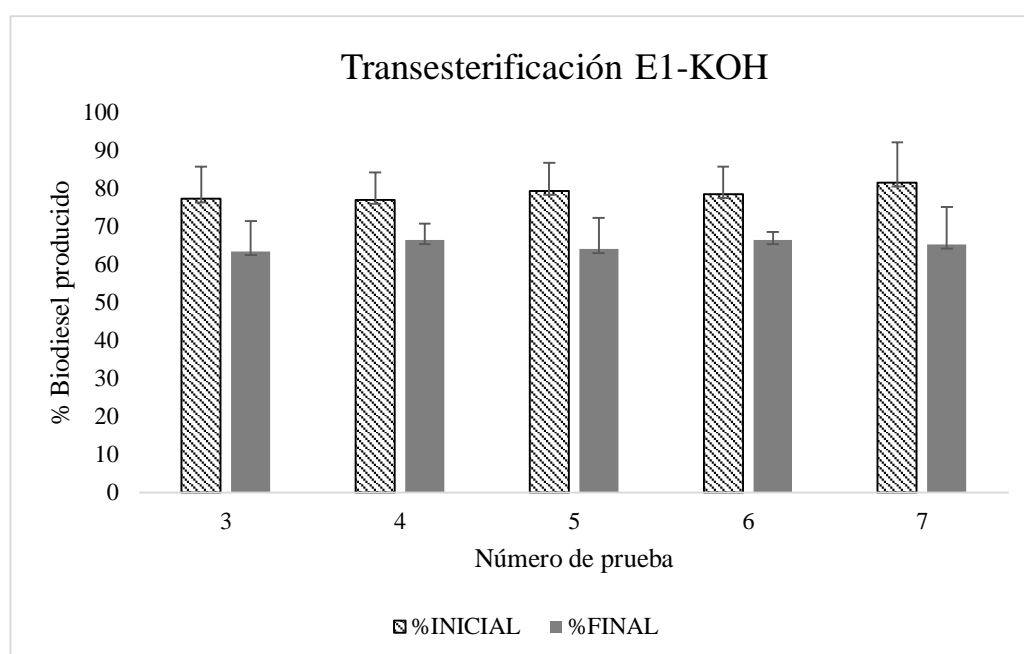
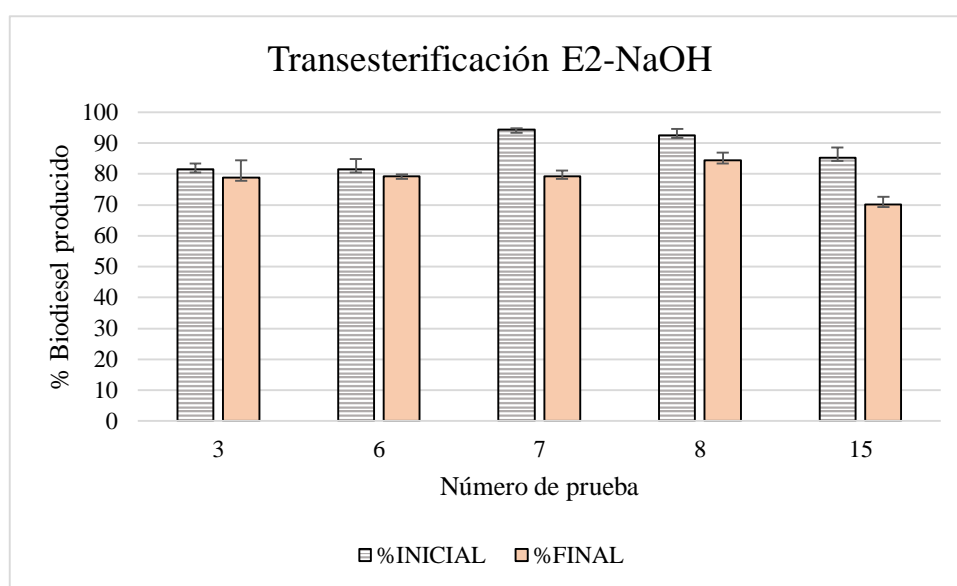


Fig. 30 Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E1-KOH

Para los resultados correspondientes a la Empresa E2-NaOH (Tabla 15) utilizando como catalizador hidróxido de sodio se obtuvieron rangos de producción finales de entre 79.3% a 95.3% equivalentes a un 70.2% y 84.4% en proporción final (Fig. 31)

Tabla 15. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E2-NaOH

Empresa E2-NaOH						
# Prueba	BI (mL)	Glicerol	%Inicial	BF (mL)	Perdida lavados (mL)	%Final
3	103.3	28.7	81.4	89.0±5.7	14.3	78.8
6	103.3	35.7	81.4	89.7±0.5	13.7	79.4
7	106.7	64.3	94.4	89.7±1.7	17.0	79.4
8	104.7	44.7	92.6	95.3±2.5	9.3	84.4
15	96.3	79.0	85.3	79.3±2.5	17.0	70.2

**Fig. 31** Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E2-NaOH

Una vez finalizado el *screening* se continuó utilizando KOH como catalizador para el cual se obtuvieron rangos de producción final de 83.7 mL a 96.7 mL (Fig. 32) correspondientes a un porcentaje de 74% y 85.6%, eligiendo a la reacción número 12 con la producción óptima (Tabla 16).

Tabla 16. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E2-KOH

Empresa E2-KOH						
No. Prueba	BI (mL)	Glicerol	%Inicial	BF (mL)	Pérdida lavados (mL)	%Final
3	101.3	20.7	89.0	87.3±8.2	14.0	77.3
4	99.3	18.0	87.9	83.7±4.0	15.7	74.0
11	106.0	26.3	93.8	94.7±0.5	11.3	83.8
12	106.0	25.7	95.6	96.7±0.9	9.3	85.6
13	107.3	37.3	95.0	93.0±2.2	14.3	82.3

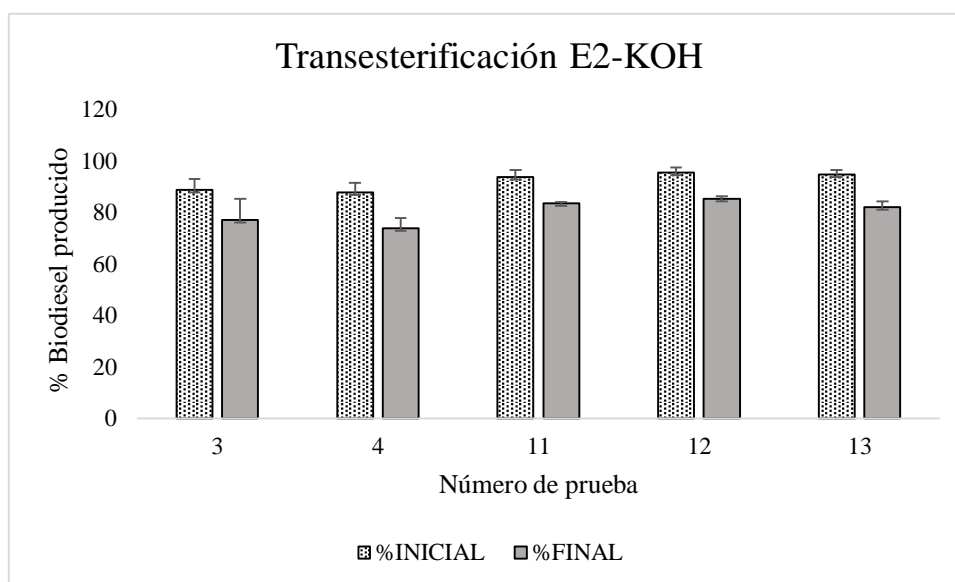


Fig. 32 Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E2-KOH

Finalmente para la Empresa E3 considerando sus condiciones de acidez y dado que su proceso de neutralización no se logró con la adición de catalizador en proporción, se incluyó un pre-tratamiento con esterificación ácida y se re-procesó con ambos catalizadores en las condiciones previamente establecidas en el diseño experimental. No se obtuvieron resultados positivos para producción con NaOH. En el caso de la utilización de hidróxido de potasio E3-KOH (Tabla 17) se obtuvieron rangos de producción de 42.7 mL a 67.3 mL equivalentes al 51.4% y 81.1% respectivamente, obteniendo la mayor productividad de biodiesel con las condiciones establecidas para la reacción número 5 (Fig. 33).

Tabla 17. Rendimiento en producción de biodiesel Empresa E3-KOH

Empresa E3						
No. Prueba	BI (mL)	Glicerol	%Inicial	BF (mL)	Pérdida lavados (mL)	%Final
3	65.3	43.4	78.7	54.3±0.17	11.0	65.5
5	74.7	49.3	90.0	67.3±11.17	7.3	81.1
7	76.7	29.7	92.4	64.3±5.17	12.3	77.5
12	48.3	51.0	58.2	42.7±1.67	5.7	51.4

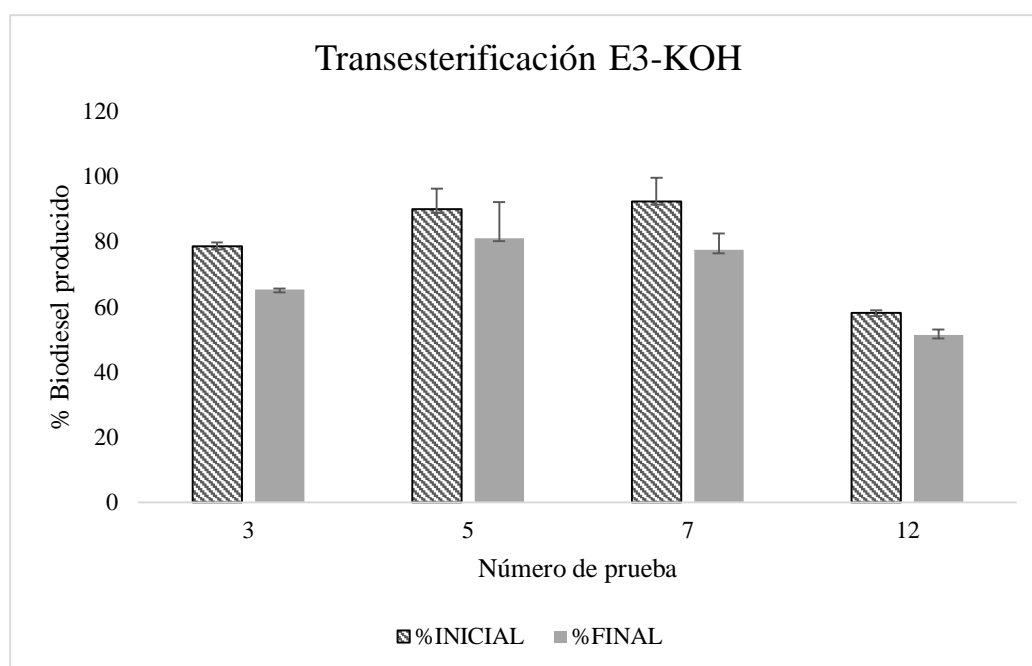


Fig. 33 Comparación de productividad inicial y final de biodiesel para E3-KOH

7.7 Optimización de parámetros para producción de biodiesel

7.7.1 Transesterificación química

Una vez obtenido el rendimiento óptimo de las variables analizadas (Tabla 18) se analizaron los parámetros de mayor importancia para su obtención.

Tabla 18. Variables óptimas de producción de biodiesel

Muestra	Temp. (°C)	%CC	RM	Tiempo (min)	RPM	Catalizador	Rendimiento inicial	Rendimiento final
E1	60	0.5	10:1	90	500	KOH	77.0	66.4
E2		1	10:1	90			95.6	85.6
E3		0.5	15:1	60			90.0	81.1

7.7.2 Temperatura y tiempo de reacción

De acuerdo a lo reportado por Pinto et al. (2005) y Guerrero Fajardo et al. (2010) la producción de biodiesel no se ve afectada por la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción, sin embargo reduce el tiempo en el cual se completa el proceso. Observando que una temperatura en un rango de trabajo entre 60-65 °C produce metilésteres entre 30 y 90 minutos es recomendable realizar la reacción a una temperatura cercana al punto de ebullición del alcohol a utilizar, en este caso metanol (64.7 °C) (Agbajelola et al. 2015; Van Gerpen, 2005).

Los resultados obtenidos para las tres empresas se alcanzaron con una temperatura de 60 °C y 90 minutos de reacción para las empresas E1 y E2 y 60 °C y 60 minutos para la empresa E3.

7.7.3 Concentración de catalizador

Los catalizadores analizados en esta etapa experimental fueron dos de los considerados “clásicos” para producción de biodiesel, hidróxido de sodio (NaOH) e hidróxido de potasio (KOH), por sus características de bajo costo, fácil almacenamiento, transporte y especialmente su alta capacidad catalítica (Refaat, 2010).

Para las empresas E1 y E2 se obtuvo producción de metilésteres con ambos catalizadores; sin embargo para la empresa E3 en ninguna de las reacciones diseñadas se obtuvo producción de biodiesel utilizando NaOH como catalizador, lo cual puede

deberse a las dificultades que presentó esta muestra dada su composición de ácidos grasos saturados y porcentaje de ácidos grasos libres al contrario del comportamiento observado al utilizar KOH, también considerada base fuerte, pero que a diferencia del NaOH presenta una mayor tolerancia a dichas moléculas.

El porcentaje de ácidos grasos saturados para la muestra E3 fue el más elevado de las tres empresas (40.7%) lo cual le brindó una consistencia sólida a temperatura ambiente.

El hecho de que la muestra tenga predominancia de ácidos grasos saturados indica que tendrá un punto de fusión más elevado dada la fuerza presentada por dichos enlaces a diferencia de los aceites, líquidos a temperatura ambiente (muestras E1 y E2), característica dada por la presencia de insaturaciones en su composición (Fig. 34) que permite que las cadenas se curven generando flexión y por lo tanto un punto de fusión más bajo (Alvis et al. 2010; Lípidos, s/a). Ya que la temperatura de freído promedio en la industria está un rango de 160-180 °C se busca utilizar un aceite que presente un mayor grado de saturación ya que puede ser utilizado por un mayor número de ciclos de freído ya que presenta una mayor estabilidad por lo que podemos asumir que haciendo una comparación entre los porcentajes de acidez presentados por las tres empresas y su composición de ácidos grasos, la muestra E3 fue la que sufrió un mayor número de ciclos de freído y por lo tanto una mayor degradación.

Para la empresa E1, se alcanzó la saturación de la reacción a partir de la incorporación de 1% de NaOH, lo cual se esperaba por la alta presencia de moléculas saponificables, esta muestra presentó el índice de acidez más elevado con 8.79% y un porcentaje de ácidos grasos saturados del 18.54%. Sabiendo que sus ácidos grasos predominantes son el ácido oleico y linoleico, podemos suponer que debido a los puntos de flexión que se presentan en sus moléculas existió una mayor probabilidad de rompimiento y formación de ácidos grasos libres. Obteniendo a su vez 16 reacciones con producción de biodiesel utilizando KOH como catalizador.

Finalmente, para la empresa E2, con una acidez de 2.73% no existió dificultad para la obtención de biodiesel con ambos catalizadores dado que la cantidad de ácidos grasos libres fue moderada, no superando el 5% de AGL, cantidad recomendada para

producción de biodiesel sin pre-tratamiento, dado su mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados, se alcanzó la saturación de la reacción en el rango de 1%-1.5% cuando se trabajó con relaciones molares entre 6:1 y 10:1, obteniendo biodiesel cuando se aumentó la cantidad de alcohol añadido a la transesterificación lo que es indicativo dado que por la naturaleza reversible de la reacción de transesterificación, las moléculas de alcohol no estuvieron lo suficientemente disponibles para forzar la formación del éster, lo que corresponde a una menor cantidad de ácidos grasos libres.

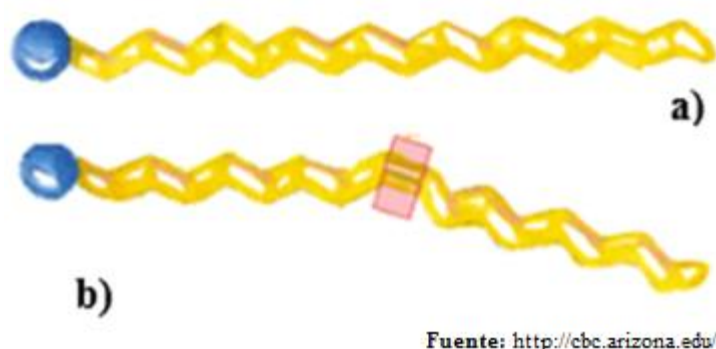


Fig. 34 a) Ácido graso saturado; b) Ácido graso insaturado.

Aun cuando se logra la obtención de biodiesel utilizando cualquiera de estos catalizadores, las condiciones de trabajo y la naturaleza de la muestra son características que deben considerarse a la hora de seleccionar el catalizador adecuado. Dada la mayor tolerancia del KOH a una cantidad elevada de ácidos grasos libres y su fácil disolución en metanol, este catalizador es empleado principalmente en plantas de producción de biodiesel. Mientras que el NaOH, al ser más económico se utiliza con mayor frecuencia en producción a menor escala.

Para las tres empresas se obtuvo un mayor rendimiento en volumen de metil ésteres con KOH (Tomasevic y Siler-Marinkovic 2003; Encinar et al. 2007; Demirbas 2009), el cual fue probado a tres concentraciones, 0.5% y 1% observando un cambio en las características de la mezcla de metóxido y aceite a partir de 1.5%, adquiriendo una apariencia “viscosa” que al unificarse en una sola fase dificultaba la agitación por la formación de geles; lo que indica la saturación de la reacción (Encinar et al. 2005). Para las tres empresas se obtuvieron los mejores resultados en un rango de concentración de 0.5 a 1% en relación al peso del aceite (Fig. 35), tomando en cuenta la acidez del aceite.

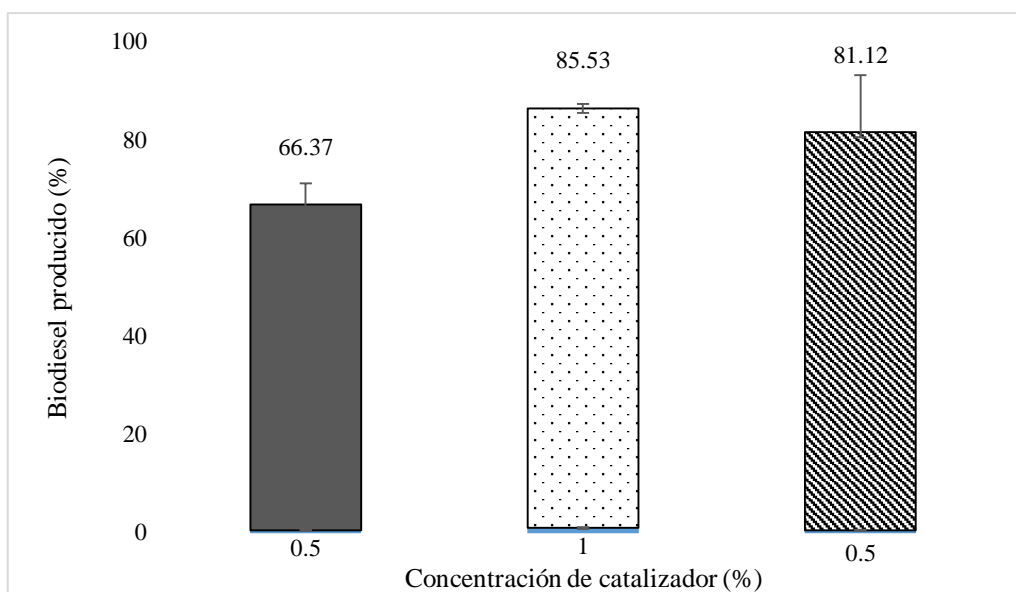


Fig. 35 Rendimiento de biodiesel en relación a la concentración de catalizador

7.7.4 Relación molar

Una de las variables de mayor importancia para la transesterificación de ácidos grasos es la relación molar (Freedman et al. 1984), ya que una de las condiciones principales que se requieren para obtener la producción de biodiesel es contar con un aceptor de grupos acilo adecuado por lo general utilizando un alcohol de bajo peso molecular como el metanol o etanol (Fukuda et al. 2010).

De acuerdo a la estequiometría de la reacción, se requieren 3 moles de alcohol por cada mol de triglicéridos para obtener un mol de glicerol y 3 moles de metil ésteres (Math et al. 2010; Highina et al. 2011) y dado que la transesterificación es una reacción que presenta un equilibrio en el que es requerido un exceso en la adición de alcohol para lograr su desplazamiento (Ma y Hanna, 1999) es recomendable utilizar un mínimo de 6:1, siendo que algunos investigadores elevan esta relación hasta 35:1 moles de alcohol por moles de aceite (Meka et al. 2007; Gupta et al. 2007; Kang y Wang, 2013), sin embargo la adición en exceso de metanol no asegura la producción de metil ésteres ya que una cantidad en exceso hace que se dificulte la recuperación de glicerol, por lo que la relación molar adecuada debe ser establecida de forma empírica (Schuchardt et al. 1998). Se utilizó metanol en cuatro relaciones molares, 6:1, 10:1, 15:1 y 20:1. Se inició con el análisis de la relación molar 6:1 para la cual no se obtuvo producción de biodiesel en ninguna de las muestras analizadas contrario a lo reportado por Leung y

Gou (2006) y Tomasevic and Siler-Marinkovic, (2003); dada la naturaleza de las muestras (aceite vegetal residual) y del deterioro propio del proceso de freído y por ende la acidez de las muestras se decidió aumentar la relación molar probando 10:1, 15:1 y 20:1 basándonos en la observación realizada por Singh et al. 2006(a) que determinó la relación entre el incremento de la relación molar y el incremento del rendimiento de biodiesel. Para las empresas E1 y E2 se obtuvo la mayor productividad con una relación molar de 10:1, mientras que para la empresa E3 la relación molar óptima fue de 15:1 (Fig. 36). Para las tres empresas se observó una tendencia de disminución en el rendimiento al aumentar la relación molar a 20:1, por lo que puede concluirse que la reacción presentó una saturación de iones hidroxilo lo que provoca dificultad de separación para las fases de biodiesel y glicerol.

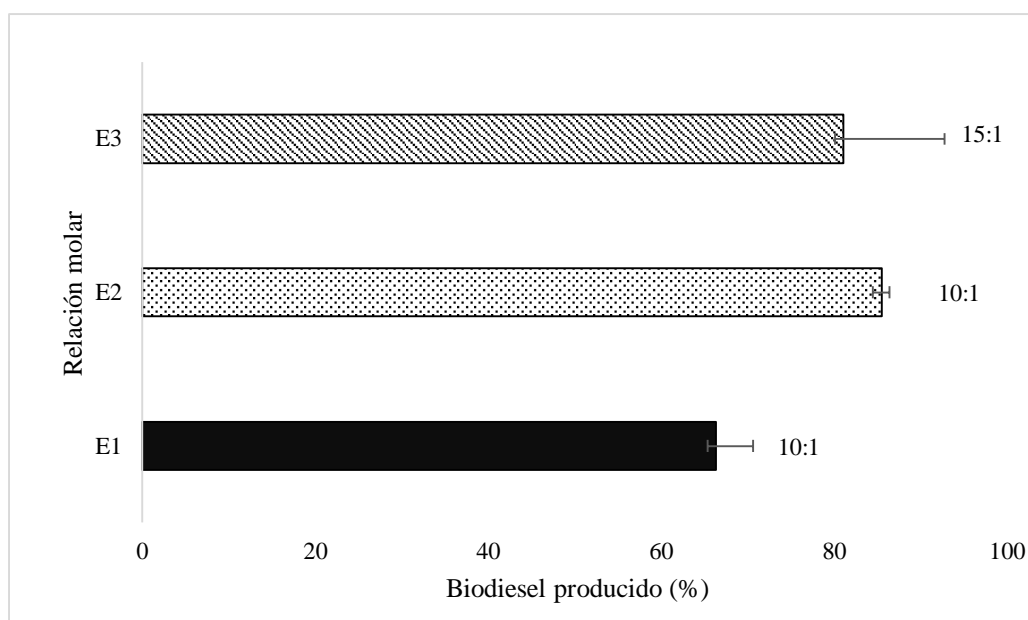


Fig. 36 Relaciones molares óptimas para producción de biodiesel a partir de aceite vegetal residual.

7.8 Lavado de biodiesel

Una vez terminada la transesterificación se requiere un proceso de purificación de biodiesel ya que el producto crudo no cumple con las especificaciones correspondientes a las normas de calidad internacionales (EN-14214 y la ASTM D6751), por lo que es necesario emplear métodos que permitan obtener un nivel de pureza que no afecten las propiedades del combustible y a su vez la vida del motor (Abbaszadeh et al. 2014). Existen diferentes métodos de lavado que ofrecen alternativas para eliminar las impurezas propias de la reacción de transesterificación. En este trabajo se emplearon dos métodos de lavado; por agitación y lavado por burbujeo. Se realizó una comparación de pérdida de volumen utilizando ambas técnicas de lavado. Se obtuvieron pérdidas de muestra en un rango de 6.5% a 10% para agitación (Fig. 37) y hasta un 15% para lavado por burbujeo (Fig. 38).

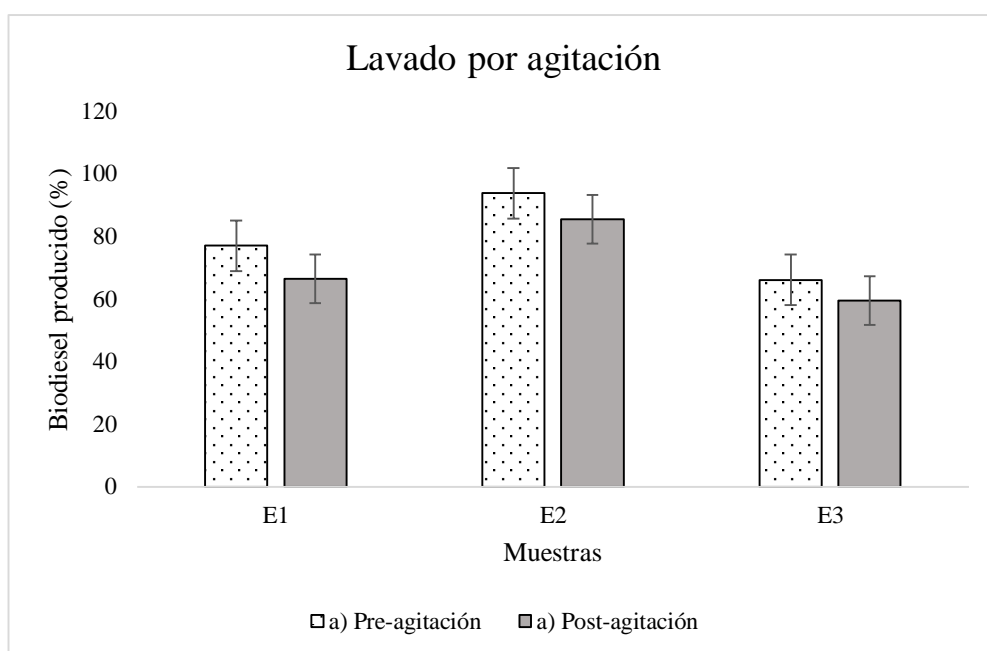


Fig. 37 Porcentaje de pérdida de muestra con la técnica de lavado por agitación.

La utilización de las técnicas de lavado que utilizan agua o “wet washing” se han reportado como un método efectivo para la reducción de cantidades residuales de metanol y glicerina presentes en la muestra a niveles aceptables para la norma EN 14214 (Berrios y Skelton, 2008), razón por la cual fueron elegidos para la realización de este trabajo.

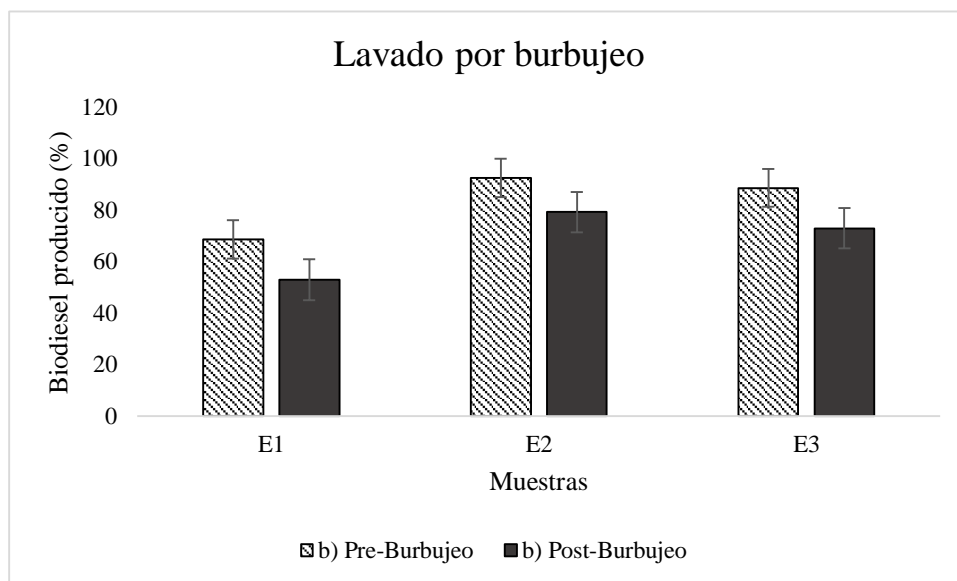


Fig. 38 Porcentaje de pérdida de muestra con la técnica de lavado por agitación.

El método de agitación es uno de los más utilizados por los pequeños y medianos productores de biodiesel, es ampliamente utilizado por su efectividad y bajo costo, sin embargo presenta dificultades cuando el contenido de jabón en la muestra es elevado ya que causa emulsificación, lo que puede conllevar a re-procesar la muestra.

Como una alternativa a este método se puede utilizar el lavado por burbujeo; este método genera una inter fase acuosa entre el aire y el biodiesel sin embargo por su naturaleza tiende a oxidar la muestra al permitir el paso de oxígeno en forma de burbujas a través de la misma (Fig. 39).

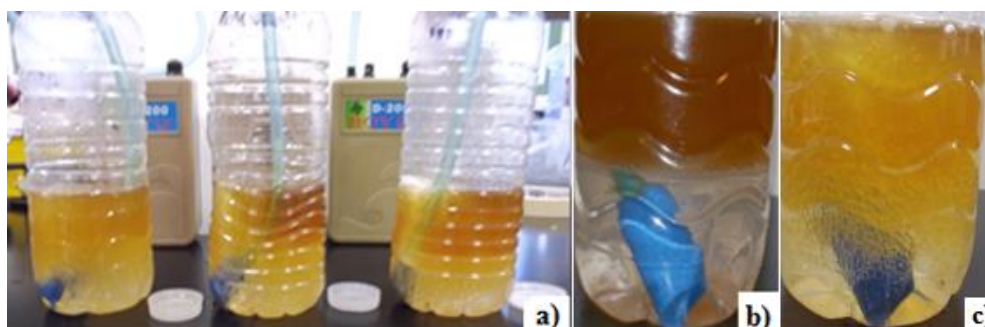


Fig. 39 a) Muestras lavados por burbujeo, b) Piedra de aireación en muestra de biodiesel, c) burbujas a través de la muestra de biodiesel.

Este método se considera adecuado para remoción de impurezas pero se recomienda la utilización del producto final (biodiesel) en un periodo menor a 6 meses ya que su almacenamiento puede tender a incrementar el deterioro del combustible a la temperatura y presión requeridas para su funcionamiento (Feizollahnejad & Ghobadian, 2008).

Al no obtener formación de emulsiones por ninguno de los métodos empleados para el lavado de las muestras, se determinó que el método de lavado por agitación resultó ser el más efectivo al permitir el retiro de impurezas en no más de tres lavados consecutivos (Fig. 40), presentar un menor porcentaje de pérdida de volumen y no afectar la calidad de la muestra de biodiesel.



Fig. 40 Apariencia de las muestras de biodiesel posteriores al lavado por agitación. a) E1, b) E2, c) E3.

7.9 Determinación de biodiesel por FT-IR

Se realizó el análisis de las muestras obtenidas por transesterificación química optimizada utilizando un espectrómetro de infrarrojo Nicolet™ iS 10 FTIR con un rango de 400 a 4000 cm^{-1} . Se lograron detectar regiones con picos de absorbancia característicos utilizados para la detección de la conversión de aceites en biodiesel (metilésteres). De acuerdo a lo observado, se detectaron picos a los 1744 cm^{-1} característico del grupo carbonilo y a los 1436 cm^{-1} característico para metil ésteres (Fig. 41), los que si bien no dan una medida directa mediante la cual se pueda monitorear el desarrollo de la reacción de transesterificación ya que no se llevó a cabo una cuantificación contra el tiempo de reacción, sino una lectura a tiempo final, si brindan un claro indicativo de la correcta unión del alcohol, en este caso metanol a los ácidos grasos para obtener la formación de los metil ésteres deseados (Lin-vien et al. 1991; O'Donnell, et al. 2013).

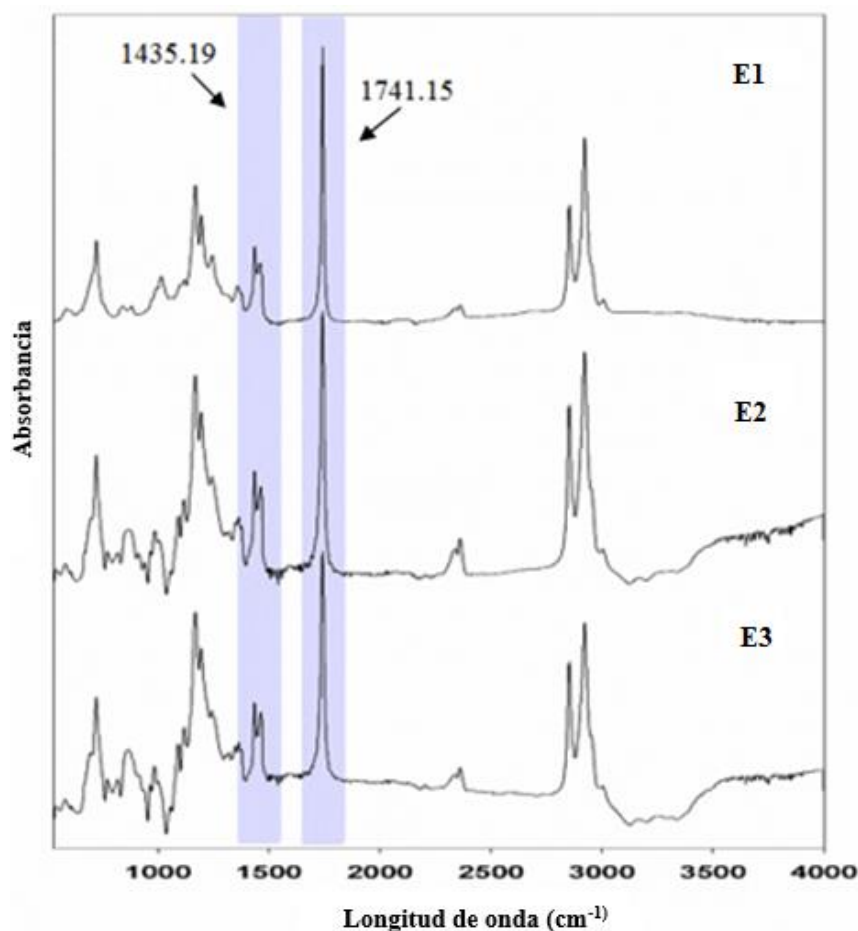


Fig. 41 Espectro de infrarrojo mostrado las regiones características de formación de biodiesel.

7.10 Determinación de parámetros de calidad

Para determinar la calidad de las muestras obtenidas de biodiesel se preparó una solución adicional al B100 (biodiesel puro) conteniendo un 80% de petro diésel y un 20% de biodiesel con la finalidad de obtener los resultados de una muestra comercial de biodiesel (B20). Se utilizaron metodologías pertenecientes a la norma internacional ASTM así como también pruebas de calidad utilizadas por los pequeños-medianos productores de biodiesel. Se seleccionaron aquellos parámetros de calidad que más frecuentemente dan resultados negativos en su determinación y que ocasionan daños severos a los motores. El resumen de los resultados tanto para el B100 como el B20 son mostrados en la Tabla 19 y Tabla 20.

7.10.1 Color y apariencia

La valoración de la apariencia de las muestras fue evaluada después del lavado y retiro de agua correspondiente para eliminación de impurezas y restos de reactivos (Fig. 42). Todas las muestras se obtuvieron en un rango de color de amarillo a café y mantuvieron estas características desde la primera determinación hasta la determinación final a los 12 meses de almacenamiento sin presencia de sedimentos y con contenido de agua ligeramente mayor pero dentro de los límites establecidos en la norma ASTM D 1796, considerando que el contenido de agua por lo general se incrementa con el tiempo de almacenamiento una vez que inicia el periodo de inestabilidad de la muestra (Focke et al. 2012).



Fig. 42 Color y apariencia de las muestras de biodiesel (1= E1, 2= E2, 3=E3). a) Primera determinación de parámetros de calidad. b) Determinación final de parámetros de calidad a los 12 meses de almacenamiento.

7.10.2 Conversión mediante prueba 27/3

Si bien la conversión a biodiesel fue confirmada por espectroscopia de infrarrojo, se utilizó una prueba complementaria, la cual se basa en el principio de miscibilidad del biodiesel en metanol. Todas las muestras analizadas (E1, E2 y E3) presentaron reacciones positivas observándose una fase sin impurezas (Parker, SK) en la primera determinación, a los 4 meses y finalmente a los 12 meses de almacenamiento (Fig. 43).

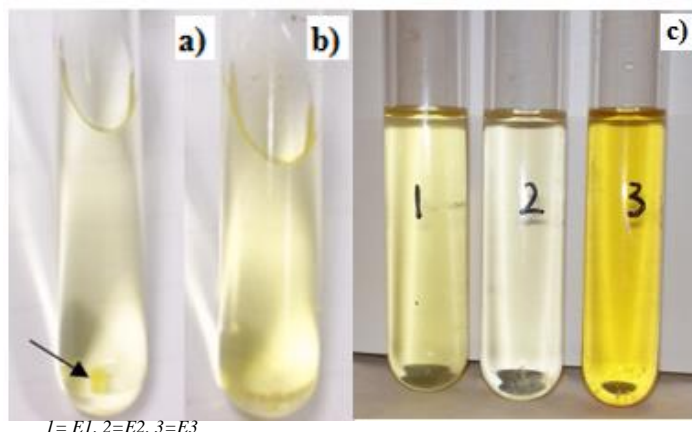


Fig. 43 a) Prueba negativa con signos de aceite sin convertir en biodiesel. b) Prueba positiva presentando una sola fase sin impurezas. c) Muestras de biodiesel positivas.

7.10.3 Determinación de pH y densidad

Todas las muestras analizadas mostraron valores de pH y densidad (Fig. 44) de acuerdo a los límites establecidos en las normas internacionales ASTM D 1298 y ASTM 6423.



Fig. 44 Determinación de densidad por método de hidrómetro.

7.10.4 Viscosidad

Dada la alta viscosidad que presentan los aceites vegetales no pueden ser empleados directamente en los motores de combustión interna (Chhreti et al. 2008) por lo que es necesario el proceso de transesterificación para reducir estos valores. Los resultados obtenidos se mantuvieron estables en las tres determinaciones de calidad dentro de un rango de 5.7 a 5.8 mm²/s.

7.10.5 Acidez total

En la determinación de este parámetro para todas las muestras se obtuvieron resultados dentro de los límites establecidos por la norma ASTM D 664 lo que permite asegurar la calidad en uno de los parámetros de mayor relevancia para el correcto funcionamiento de los sistemas de inyección (Hossain and Mazen, 2010).

7.10.6 Punto de nube y punto de vertido

Si bien estos parámetros no presentan un límite mínimo en las normas internacionales son de gran importancia al considerar utilizar el combustible en su forma pura (B100) ya que pueden afectar el sistema de combustión al causar bloqueos cuando se forman cristales (Fig. 45), el determinado punto de nube como lo define Ali et al. (1995). Y aún de mayor relevancia, es necesario determinar la temperatura más baja a la cual el combustible aún permanece en su forma líquida (punto de vertido).

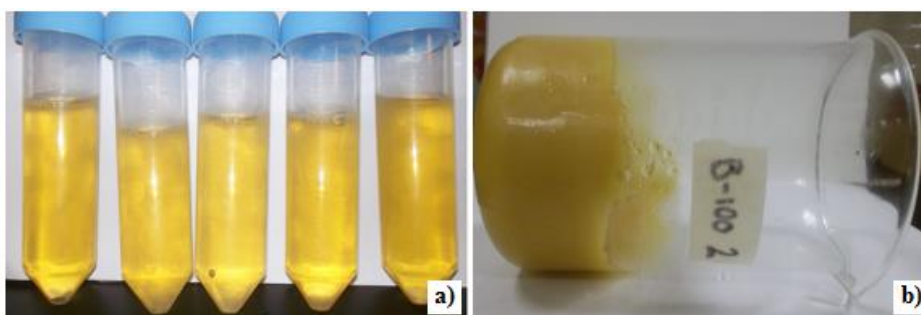


Fig. 45 a) Muestras de biodiesel con formación de cristales. b) Muestra de biodiesel en estado sólido.

Para la empresa E1 se mantuvo un rango de punto de nube de 3.0 °C a 5.0 °C, para la empresa E2 se mantuvo de 13.3 °C a 15.7 °C mientras que para la E3 se observó un rango de 11.7 °C a 16.0 °C. Se observó que todas las muestras tuvieron el mismo

comportamiento; en el que aumentaron entre 2 °C a 5 °C en un periodo de almacenamiento de 12 meses, siendo la empresa E2 la que presentó el punto de nube más elevado. Dado que este parámetro está relacionado directamente con la composición de ácidos grasos presentes en la muestra, debe considerarse el análisis del grado de insaturación presente en las mismas, ya que un mayor grado de insaturación mantiene una influencia directa sobre la temperatura cristalización o punto de nube influenciado por el arreglo disruptivo que altera su capacidad de embalaje (Nascimento et al. 2005). Tomando en consideración el grado de insaturación de las muestras, aquella que presentó la menor temperatura de punto de nube, la muestra E1, corresponde con el mayor grado de ácidos grasos insaturados. De igual manera, al considerar esta característica para la empresa E2 y E3 encontramos la presencia de ácidos grasos saturados, los cuales le brindan un número de cetano elevado, mayor estabilidad y por consiguiente menor susceptibilidad a la oxidación; presentando cristalización a temperaturas más altas (Canacki, 2007). lo que se traduce en que a temperaturas más elevadas (ambiente) las grasas saturadas se encuentran en estado sólido, a diferencia de los aceites vegetales (Öner and Altun, 2009).

7.10.7 Punto de chispa y punto de ignición

Los resultados obtenidos para este parámetro (punto de chispa) se encontraron dentro de los límites establecidos en la norma internacional ISO CD 3679. Adicionalmente se determinó el punto de ignición de las muestras, encontrándose para todas en un rango de 15 °C a 20 °C más a la temperatura del punto de chispa. Este parámetro es de relevancia ya que el manejo del biodiesel se torna más seguro al tener un punto de ignición más elevado que el petrodiesel (Fig. 46).



Fig. 46 Muestra de biodiesel llegando al punto de ignición.

Se presenta un resumen de los parámetros determinados para las muestras de biodiesel puro (B100) en sus tres determinaciones.

Tabla 19. Parámetros de calidad B100. a) Primera determinación, b) Segunda determinación a los 4 meses de almacenamiento, c) Tercera determinación a los 12 meses de almacenamiento.

a)	Pruebas de calidad							Primera determinación			
B100											
	pH	Color	ρ	27/3	CP °C	PP °C	TAN	FP °C	IP °C	V	AS %
E1	6.5	Amarillo	0.873	√	4	-2.0	0.3	175	192	5.8	0.01
E2	6.0	Pardo	0.867	√	13.3	5.5	0.5	168	185	5.7	0.02
E3	6.5	Amarillo	0.867	√	11.7	6.0	0.3	170	191	5.7	0.02
b)	Pruebas de calidad							Segunda determinación			
B100											
	pH	Color	ρ	27/3	CP	PP	TAN	FP	IP	V	AS
E1	6.5	Amarillo	0.873	√	5.3	-1.8	1.93	180	198	5.8	0.01
E2	6.0	Pardo	0.867	√	15.3	6.3	1.93	183	200	5.7	0.01
E3	6.5	Amarillo	0.867	√	16	7.6	1.13	175	195	5.7	0.01
c)	Pruebas de calidad							Tercera determinación			
B100											
	pH	Color	ρ	27/3	CP	PP	TAN	FP	IP	V	AS
E1	6.5	Amarillo	0.868	√	3.2	0	0.8	163	175	5.8	0.03
E2	6.0	Pardo	0.850	√	15.7	10.7	0.8	177	185	5.7	0.03
E3	6.5	Amarillo	0.860	√	16	10.2	0.7	168	187	5.7	0.03

P= densidad, CP= Cloud point (punto de nube, PP= Pour point (punto de vertido), FP= Flash point (punto de chispa), IP= Ignition point (punto de ignición), V= Viscosidad, AS= Agua y sedimentos.

Se consideró la mezcla B20 como representativa de combustible comercial a la cual se le determinaron los parámetros de calidad correspondientes al biodiesel puro (B100). Todos los parámetros fueron encontrados dentro de los límites correspondientes a las normas internacionales (Tabla 20).

Tabla 20. Parámetros de calidad B20. a) Primera determinación, b) Segunda determinación a los 4 meses de almacenamiento, c) Tercera determinación a los 12 meses de almacenamiento

a)	Pruebas de calidad										Primera determinación
	B20										
	pH	Color	ρ	27/3	CP °C	PP °C	TAN	FP °C	IP °C	V	AS %
E1	6.5	Amarillo	0.843	√	1	-7	0.4	80	97	4.0	0.03
E2	6.6	Pardo	0.843	√	3	-7	0.4	78	92	4.0	0.03
E3	6.7	Amarillo	0.845	√	1	-7	0.4	83	98	4.1	0.03
b)	Pruebas de calidad										Segunda determinación
	B20										
	pH	Color	ρ	27/3	CP	PP	TAN	FP	IP	V	AS
E1	6.2	Amarillo	0.873	√	5.3	-1.8	0.4	180	198	4.0	0.03
E2	6.0	Pardo	0.867	√	15.3	6.3	0.4	183	200	4.0	0.03
E3	6.2	Amarillo	0.867	√	16	7.6	0.4	175	195	4.1	0.03
c)	Pruebas de calidad										Tercera determinación
	B20										
	pH	Color	ρ	27/3	CP	PP	TAN	FP	IP	V	AS
E1	6.3	Amarillo	0.838	√	-9	-10	0.1	90	102	4.0	0.03
E2	6.6	Pardo	0.826	√	-7.7	-7.6	0.1	93.3	112	4.0	0.03
E3	6.3	Amarillo	0.838	√	-5.3	-9	0.1	90	103	4.1	0.03

P= densidad, CP= Cloud point (punto de nube, PP= Pour point (punto de vertido), FP= Flash point (punto de chispa), IP= Ignition point (punto de ignición), V= Viscosidad, AS= Agua y sedimentos.

7.11 Obtención de microorganismos de muestras de suelos

Se obtuvieron 100 aislados por medio de aislamiento directo y de aislamiento mediante uso de inductores (Tabla 21) compuestos de 26 cepas fúngicas (Fig. 47) y 74 cepas bacterianas (Fig. 48). Una vez obtenido su cultivo puro y definido sus características se procedieron a resembrar en tubos de agar inclinado para bacterias y llevadas a conservación a 4 °C. Mientras que para hongos se prepararon crioviales con solución de glicerol al 10% para ser preservadas a -20 °C.

Tabla 21. Obtención de cepas de acuerdo a la fuente de aislamiento

Tipo de aislado	Aislamiento directo (AD)	Aceite de oliva (AO)	Aceite de canola (AC)	Aceite Residual (AR)	Total
Bacterias	26	21	11	16	74
Hongos	17	3	6	0	26



Fig. 47 Ejemplo de cepas de hongos aisladas

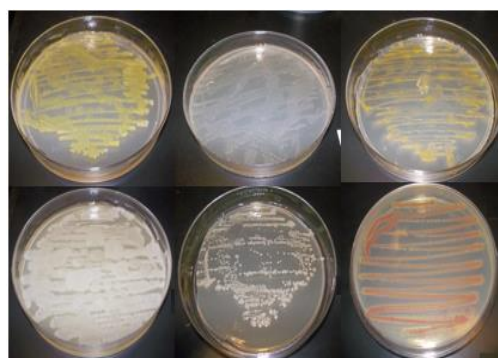


Fig. 48 Ejemplo de cepas de bacterias aisladas

7.12 Evaluación cualitativa y semi-cuantitativa de actividad lipolítica para selección de cepas

Se seleccionó Rodamina B por presentar su mecanismo de operación mediante complejos formados entre el tinte y la acción de las lipasas sobre el aceite utilizado como sustrato evidenciado mediante la liberación de ácidos grasos; este ensayo fue presentado para lipasas bacterianas por Kouker y Jaeger (1987) contrario de las técnicas que utilizan Tween 80 y tributirina para las cuales se han observado zonas de clarificación difusas llegando a mostrarse indeterminables, éste último (tributirina) considerado como un ensayo inespecífico dado que también detecta actividad esterasa,

siendo el ensayo con Rodamina B ampliamente utilizado (Cárdenas et al. 2001; Carissimi et al. 2007; Kim et al. 2010; Kumar et al. 2012; Lawrence et al. 1967; Samad et al. 1989; Sierra, 1957).

Se determinó la actividad lipolítica de forma cualitativa (Tabla 22) y semi-cuantitativa utilizando la observación de fluorescencia como indicativo de presencia de actividad lipolítica obteniendo un total de 52 cepas.

Tabla 22. Determinación cualitativa de cepas positivas para lipasas

Tipo de aislado	Aislamiento directo (AD)	Aceite de oliva (AO)	Aceite de canola (AC)	Aceite Residual (AR)	Total
Bacterias	12	12	4	10	38
Hongos	6	3	5	0	14

Se utilizaron 3 cepas fúngicas como control (HIB 10 HIB 31 y HIB 3) reportadas como positivas (Fig. 49) para presencia de enzimas lipolíticas las cuales fueron obtenidas de la colección del Instituto de Biotecnología de la FCB-UANL (Gandarilla Pacheco, 2012). Todos los ensayos realizados tuvieron 6 repeticiones distribuidas en 2 ensayos independientes.



Fig. 49 Cepa control con actividad lipolítica

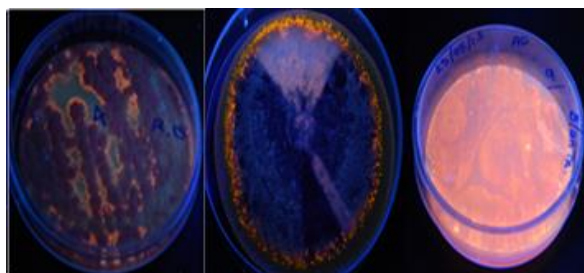


Fig. 50 Ejemplos de cepas con actividad lipolítica

Se observó que un tiempo de 96 h fue suficiente para determinar de manera cualitativa la presencia de fluorescencia bajo luz UV a 350 nm (Fig. 50).

Adicionalmente a la observación de la fluorescencia naranja se utilizó el criterio de intensidad de fluorescencia (Fig. 51) para cepas bacterianas siguiendo los criterios de Rabbani et al. (2013) y Carissimi et al. (2007) de las cuales se seleccionaron solo aquellas cepas bacterianas que coincidieron en categoría 3 a partir de 6 repeticiones

(Tabla 23) para proseguir con la semi-cuantificación enzimática extracelular. Para las cepas fúngicas positivas no se consideró el parámetro de intensidad de fluorescencia al no observar diferencias entre las cepas positivas. Se estableció un tiempo de contacto entre el sustrato y la cepa de 144 h con la finalidad de permitir un desarrollo adecuado de los microorganismos.

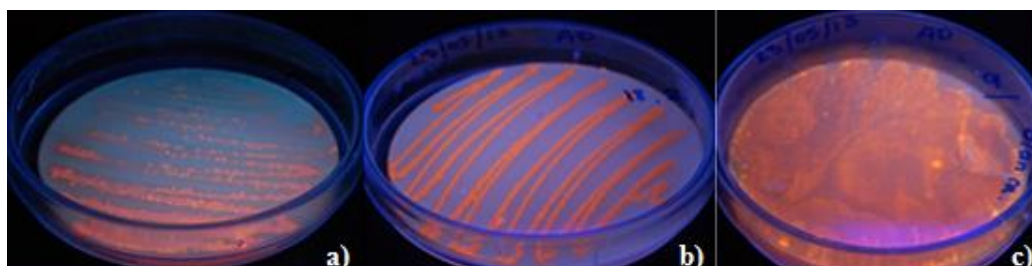


Fig. 51 Criterio para determinación de intensidad de fluorescencia. a) Intensidad 1 o baja, b) Intensidad 2 o intermedia, c) intensidad 3 o alta

Tabla 23. Intensidad de Fluorescencia de cepas bacterianas con actividad lipolítica

Cepa	Intensidad		Cepa	Intensidad		Cepa	Intensidad		Cepa	Intensidad	
1	2	1	11	3	3	21	2	1	31	3	3
2	3	3	12	3	3	22	1	1	32	3	2
3	2	2	13	3	2	23	3	1	33	3	2
4	3	2	14	1	1	24	2	2	34	3	2
5	3	3	15	1	1	25	2	1	35	3	3
6	2	3	16	2	2	26	3	1	36	3	3
7	1	1	17	2	1	27	2	2	37	3	2
8	1	3	18	1	1	28	1	1	38	3	3
9	3	1	19	2	2	29	1	1			
10	1	1	20	1	1	30	3	3			

Una vez obtenidas las cepas consideradas como positivas, se procedió a la determinación semi-cuantitativa de su actividad lipolítica extracelular con la finalidad de categorizar el potencial de las mismas (Fig. 52).

Para cepas bacterianas después de 48 h de tiempo de contacto se obtuvo que la cepa 12 presentó la mayor actividad con un diámetro de 10.7 mm seguida por la cepa 38 (Tabla 24).

Tabla 24. Diámetro de halo para cepas bacterianas con actividad lipolítica

Cepa	2 ^{ab}	5 ^{bc}	11 ^a	12 ^c	30 ^{abc}	31 ^{abc}	35 ^{abc}	36 ^{ab}	38 ^c
Halo (mm)	3.8	8.8	2.0	10.7	7.5	6.8	4.6	4.0	10.6

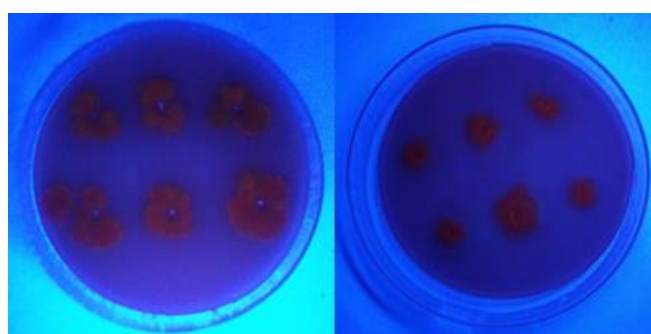


Fig. 52 Siembra de sobrenadante bacteriano en placa de Agar rodamina B

Si bien se observan diferencias en el crecimiento presentado por las cepas fúngicas cabe mencionar que el desarrollo obtenido en placas cuyo sustrato es aceite de oliva es de importancia ya que denota la capacidad del microorganismo de utilizar esta como su fuente de carbono y por lo tanto indica que cuenta con la maquinaria enzimática capaz de procesar estas moléculas. Basándonos en esto, la cepa 18 presentó el mayor crecimiento con un halo de 40.5 mm seguido de la cepa 11 con 39.3 mm.

Tabla 25. Diámetro de halo para cepas bacterianas con actividad lipolítica

Cepa	1 ^{ab}	2 ^{ab}	3 ^{ab}	4 ^{ab}	11 ^{ab}	18 ^{ab}	19 ^{ab}	22 ^a	23 ^{ab}	24 ^b	26 ^a
Halo (mm)	30.7	28.7	24.3	25.0	39.3	40.5	30.2	32.0	39.4	38.7	31.0

7.13 Ensayo para cuantificación de actividad lipolítica

7.13.1 Análisis preliminar

De la evaluación preliminar, se eligieron 3 cepas bacterianas y 3 cepas fúngicas; si bien como característica principal de selección fue su tamaño de halo, también se tomaron en cuenta características como el rápido crecimiento y capacidad de esporulación. Se obtuvieron resultados concordantes en cuestión de mayor actividad con los resultados obtenidos de los análisis semi-cuantitativos tanto para bacterias como para hongos (Tabla 26). Para todas las determinaciones se utilizó una curva estándar de p-nitrofenol (Fig 53) y el sobrenadante de una cepa de *Bacillus subtilis* positiva para presencia de enzimas lipolíticas como control positivo (Fig. 54).

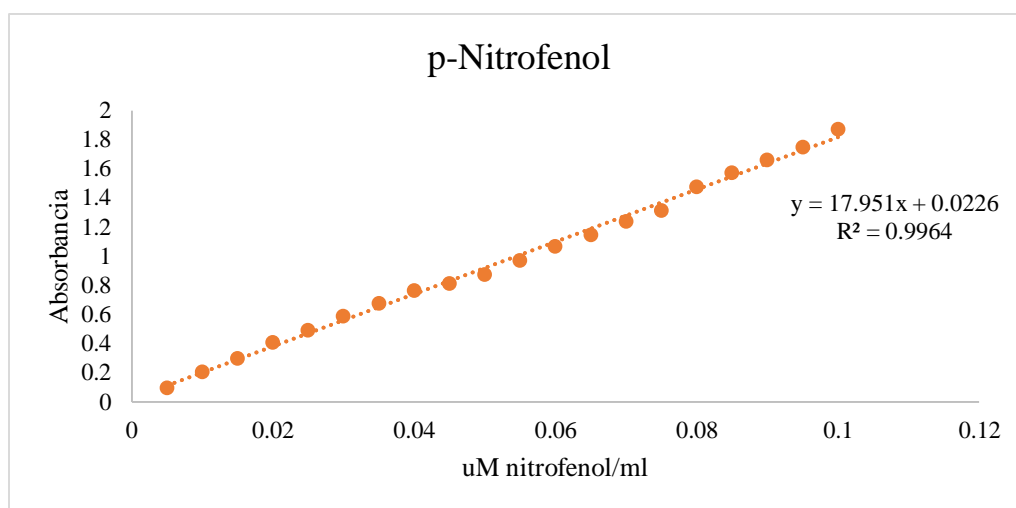


Fig. 53 Curva estándar de p-nitrofenol

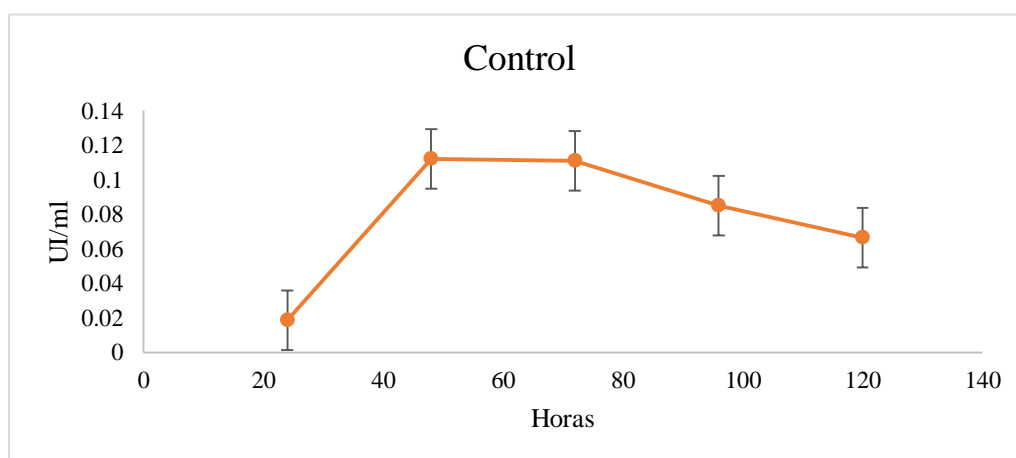


Fig. 54 Resultados de cepa control

7.14 Ajuste de pH

Al observar los resultados del análisis preliminar se detectaron variaciones de actividad importantes y dado que la presencia de lipasas y su respectiva actividad enzimática presentaron una amplia variedad en los distintos microorganismos se realizó un ajuste de pH, repitiendo experimentos para pH 7 y adicionando pH 8 y pH 9.

Para lipasas bacterianas los resultados arrojaron que la cepa 12 presentó la mayor actividad de las 3 cepas seleccionadas del análisis semi cuantitativo con una actividad de 480 UI/L a las 120 horas de incubación con un pH óptimo de producción de 7.

Para la cepa 35 se obtuvieron valores de producción de lipasas de 219 UI/L a las 48 h de incubación y un pH de 8.

Mientras que para la cepa 38 se obtuvo una producción de 259 UI/L a las 96 horas de producción y pH 8 (Fig. 55).

En el caso de las lipasas fúngicas se obtuvieron resultados de producción menores a los encontrados en las lipasas bacterianas por lo que se decidió continuar solamente con aquellos que presentaron los valores máximos de producción. Para la cepa 11 se obtuvo un valor máximo de producción de 390 UI/L a las 144 h de incubación con un pH de 9.

En el caso de la cepa 18 se obtuvo un valor de 374 UI/L a las 168 h de incubación y un pH de 8 y finalmente para la cepa 24 se obtuvo un valor máximo de 337 UI/L a las 48 h de incubación y un pH de 8 (Fig. 56).

Si bien el tiempo de producción no coincidió para ninguna de las 3 cepas analizadas con las 72 horas reportadas como tiempo de máxima producción de numerosas lipasas (Lee et al. 2007; Wang et al. 2012) existen reportes de lipasas alcalinas extracelulares que presentan esta característica con tiempos de máxima producción variables en un rango de 48 a 120 h (Smaniotto, et al. 2012; Ramesh et al. 2014; Willerding, et al. 2011).

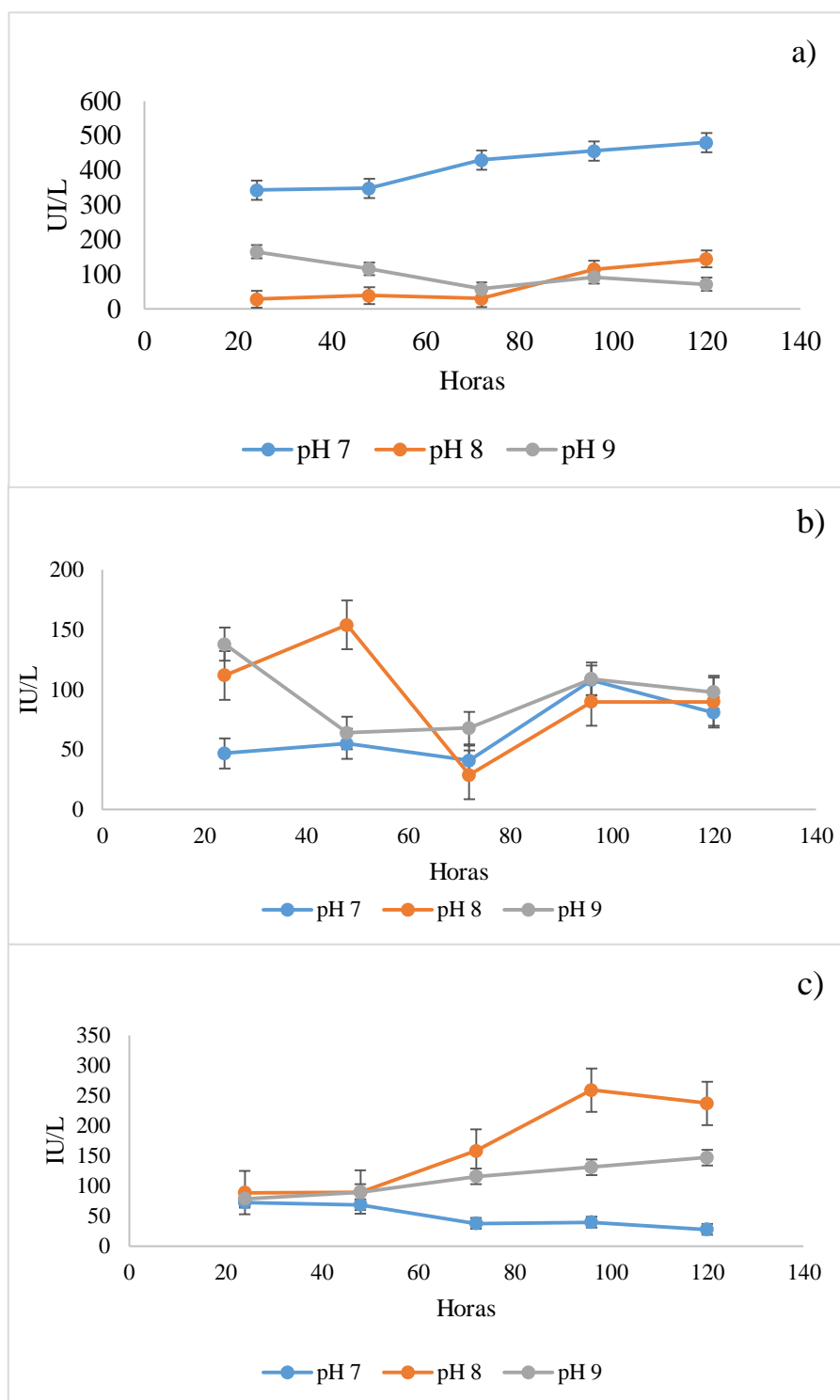


Fig. 55 Producción enzimática a diferentes pH. a) Cepa 12, b) Cepa 35, c) Cepa 38.

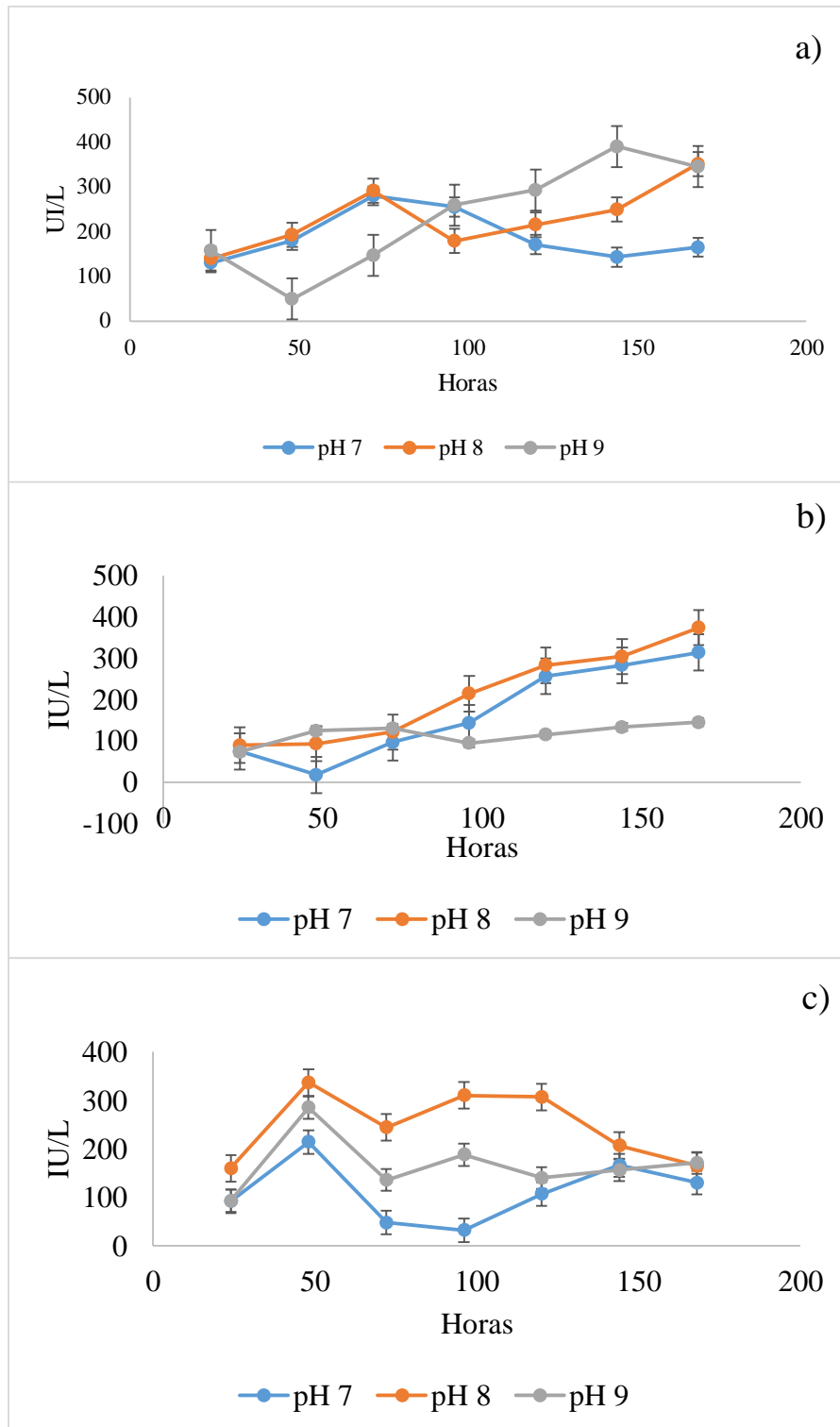


Fig. 56 Producción enzimática a diferentes pH. a) Cepa 11, b) Cepa 18, c) Cepa 24

7.15 Liofilización de extractos crudos

Adicionalmente se analizaron los liofilizados tanto bacterianos (Fig. 57) como fúngicos que fueron preparados con la finalidad de obtener una forma de presentación en polvo para la reacción de transesterificación.

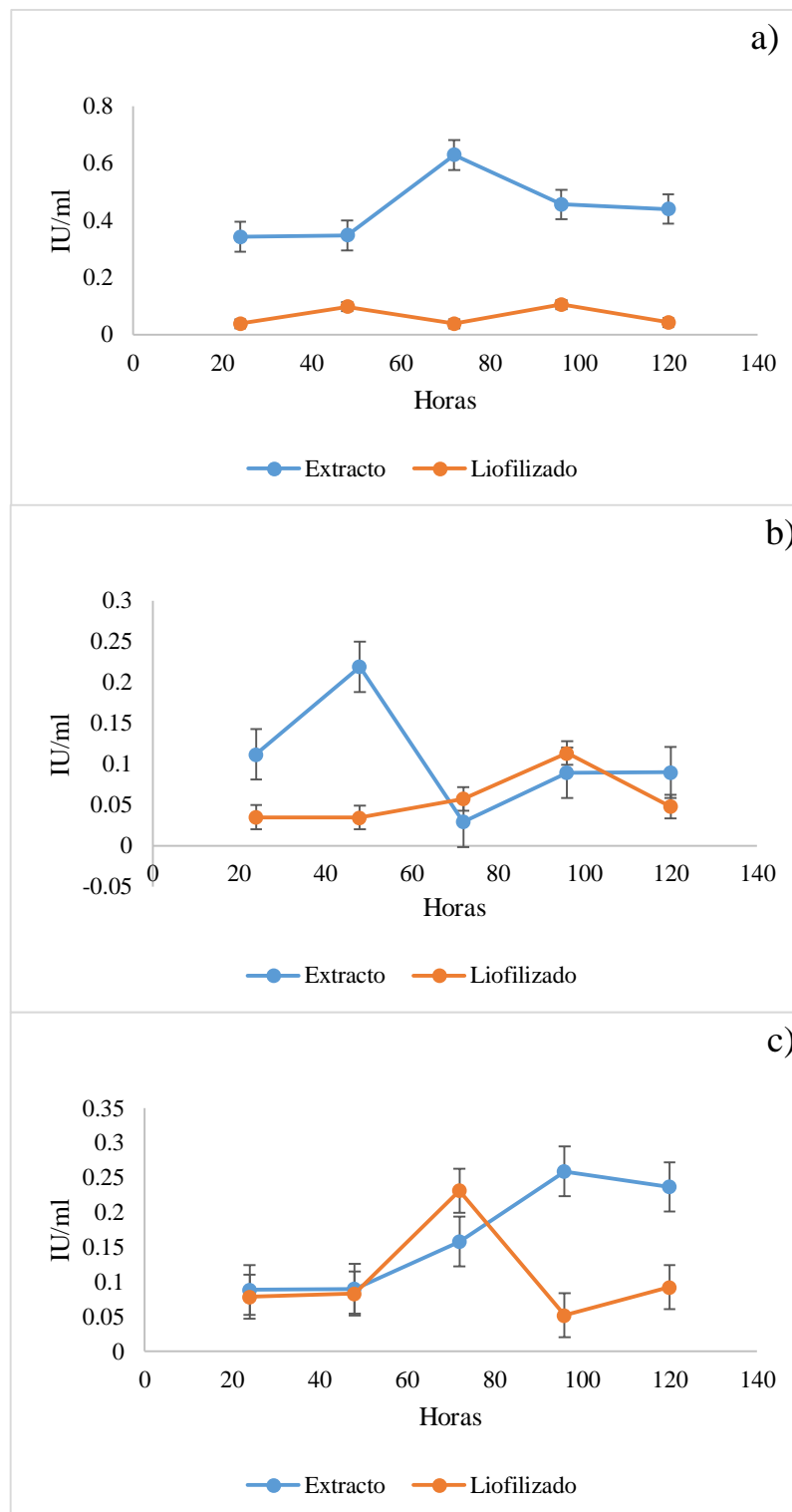


Fig. 57 Comparación de actividad lipolítica bacteriana de extracto crudo vs. Liofilizado. a) Cepa 12, b) Cepa 35, c) Cepa 38

Sin embargo y dado que las lipasas requieren de una interfase lípido-agua para su funcionamiento y el principio de la liofilización recae precisamente en la remoción de la misma pudimos observar una caída en la actividad para todas las cepas analizadas (Fig. 58) concordante con lo analizado por Caldwell et al, (1991) y contrastante con lo observado por Sundari y Adholeya (2000), en el que si bien no observaron reducción en la actividad esterasa/lipasa mencionan que las diferencias en este comportamiento recaen sobre el tipo de microorganismos sobre los que se trabaja y el protocolo utilizado para liofilización.

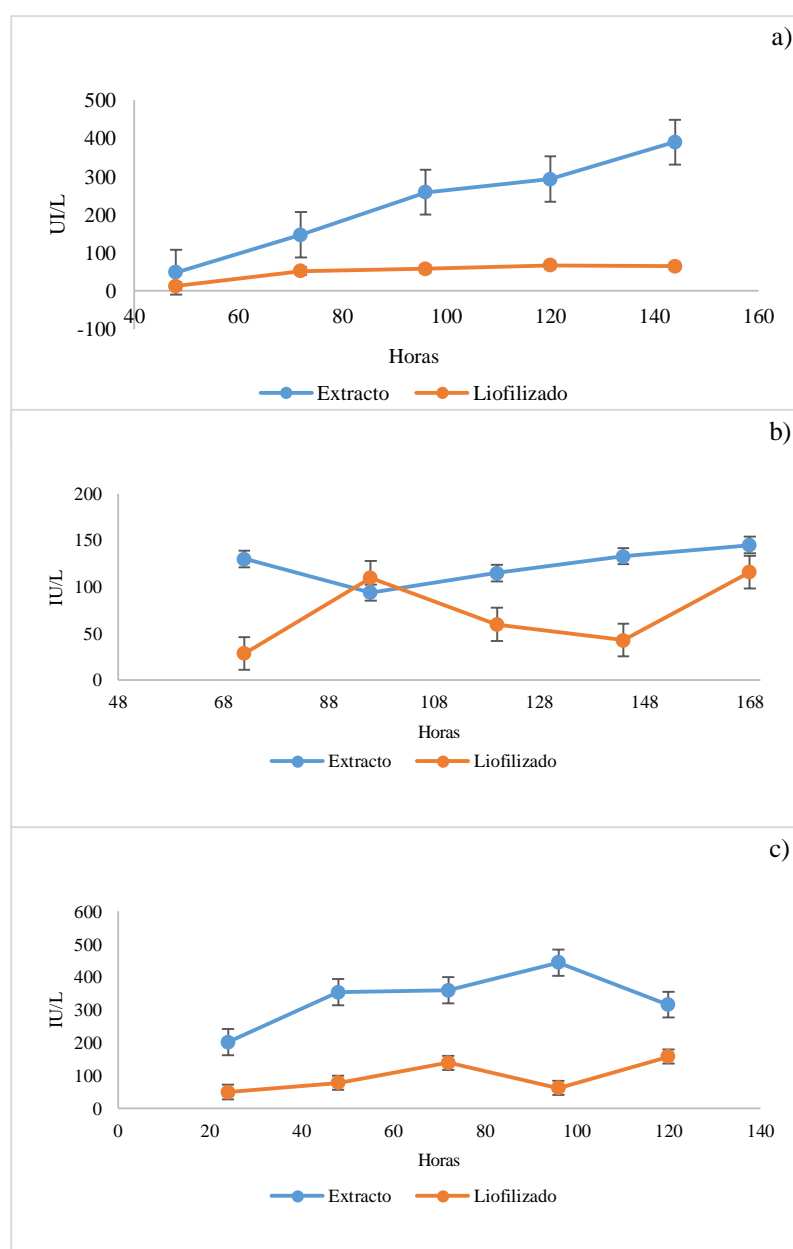


Fig. 58 Comparación de actividad lipolítica fúngica de extracto crudo vs. Liofilizado. a) Cepa 11, b) Cepa 18, c) Cepa 24.

7.16 Actividad intracelular

Dado que el objetivo principal era obtener un extracto crudo con la finalidad de utilizarlo como biocatalizador se buscó la presencia de enzimas extracelulares. Se determinó la actividad intracelular de las cepas seleccionadas para las cuales se obtuvieron 113 UI/L para la cepa 12, 72 UI/L para la cepa 35 y 66 UI/L para la cepa 38 los cuales están dentro del rango reportado (Kumar et al. 2012) considerando que las muestras cuantificadas son extractos crudos sin purificar. En el caso de las cepas fúngicas, la cepa 11 presentó una actividad de 468 IU/L, la cepa 18 con 383 UI/L y cepa 24 con 168 UI/L las cuales obtuvieron los mejores rendimientos a partir de inductores como aceite de oliva (Iftikhar et al. 2008) concordando con nuestra estrategia de inducción y que si bien se mostraron menores a las actividades extracelulares obtenidas el tiempo de máxima producción fue de 24 h característica de importancia dado que provienen de un sistema sin purificación.

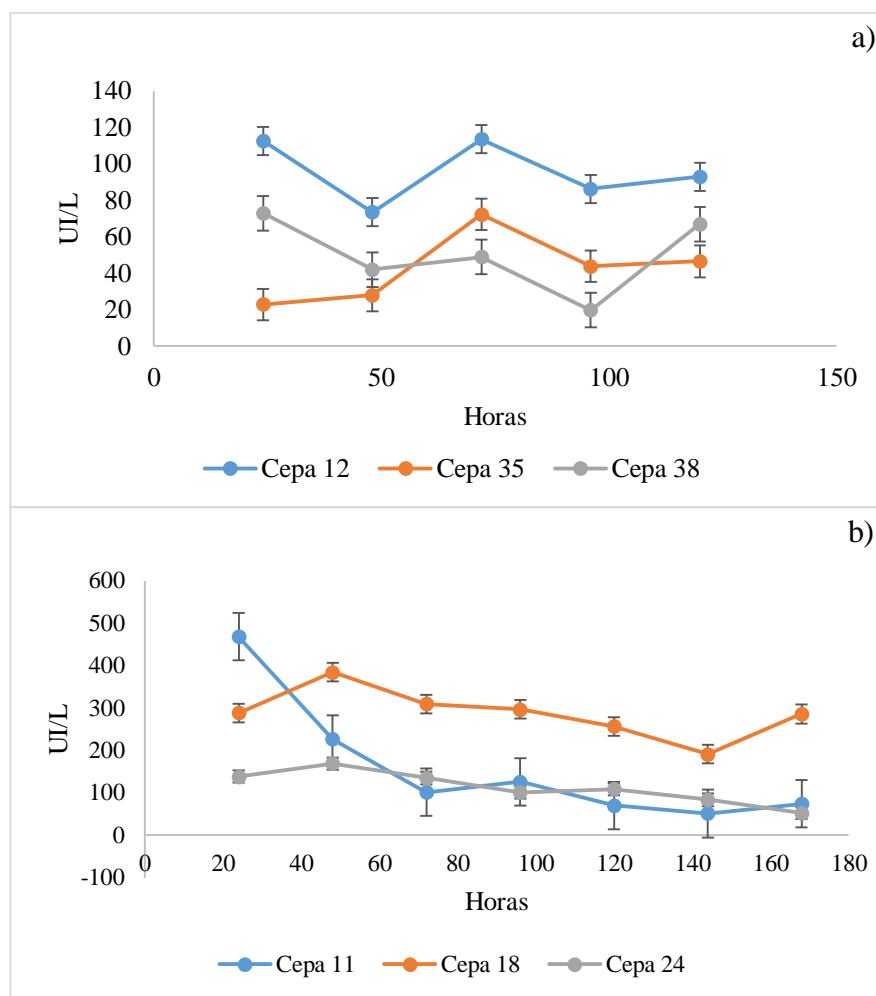


Fig. 59 Actividad intracelular. a) Cepas bacterianas, b) Cepas fúngicas

7.17 Selección de biocatalizador

En base a los resultados obtenidos (Fig. 60) de los ensayos de cuantificación lipolítica utilizando nitrofenil palmitato como sustrato y a las características inherentes de las cepas utilizadas se decidió proseguir con el sobrenadante crudo de la muestra proveniente de la cepa 12.

Fig. 60 Resumen de actividades lipolíticas

Fuente de obtención	Valores (UI/L)		
Bacterias	Cepa 12	Cepa 35	Cepa 38
Extracelular	480	219	259
Liofilizado	105	113	231
Intracelular	113	72	66
Hongos	Cepa 11	Cepa 18	Cepa 24
Extracelular	390	374	337
Liofilizado	65	116	158
Intracelular	468	383	168

7.18 Identificación molecular

Considerando exclusivamente su actividad extracelular se seleccionó a la cepa 12 para continuar con el proceso de obtención de biodiesel. Se obtuvo la secuencia para su gen 16S pudiendo determinar su identidad a nivel de género (Fig. 62). Previamente se realizó su caracterización morfológica presentando coloración blanca-grisácea, forma redonda y tamaño pequeño (menor a 3 mm de diámetro) (Fig. 61) con tinción Gram positiva.



Fig. 61 Cepa 12

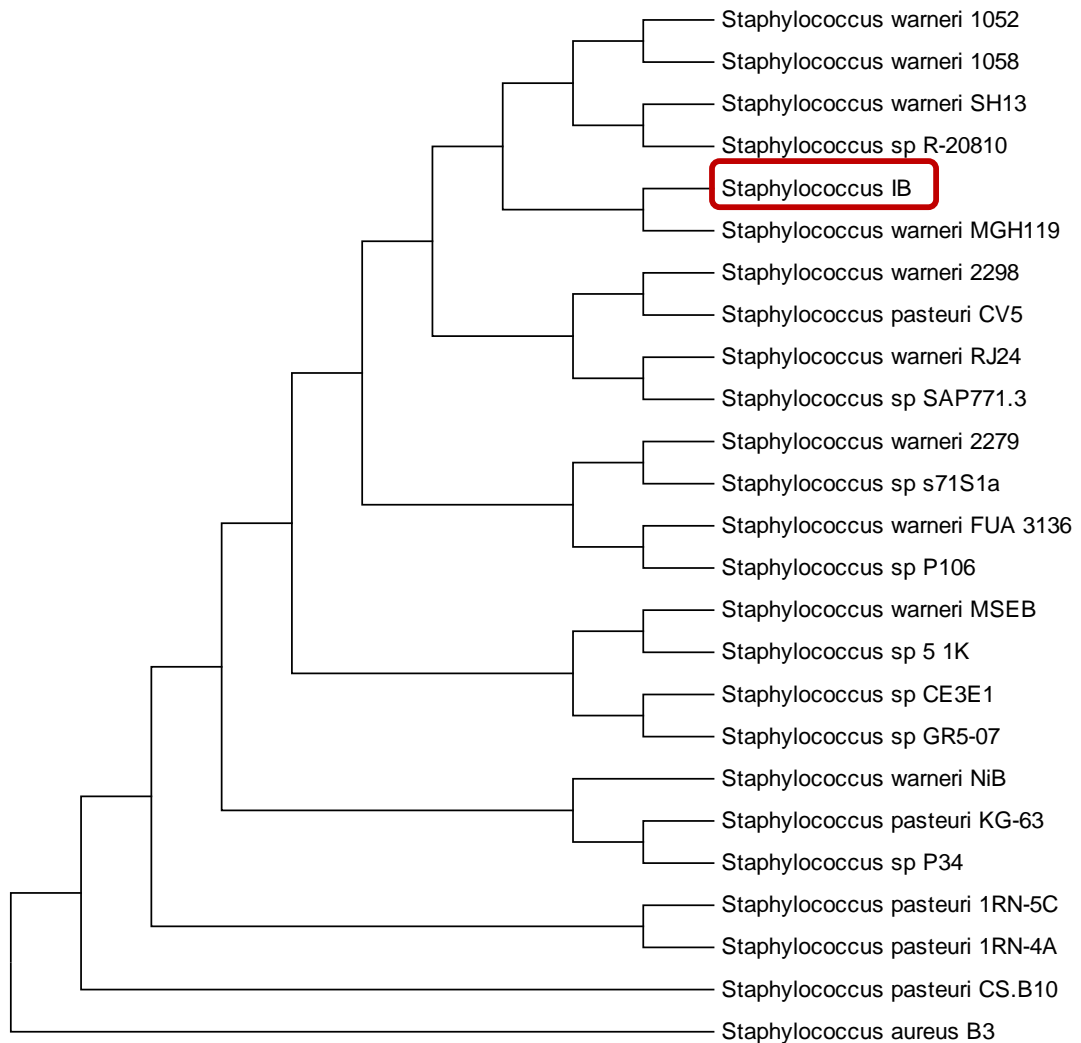


Fig. 62 Árbol filogenético para la cepa 12

El gen 16S rRNA presenta características ideales para estudiar la taxonomía bacteriana. Es uno de los más comúnmente utilizados dada su presencia en casi todas las bacterias y debido a que su tamaño es lo suficientemente grande (1500 pb) lo que es lo bastante útil para propósitos bioinformáticos (Patel, 2001).

Este gen fue utilizado para determinar la identidad molecular del aislado catalogado como “Cepa 12” y como conclusión de este análisis se infiere que la secuencia proviene de una especie emparentada con *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus pasteuri*, encontrándose encriptado dentro del grupo filogenético de *S. warneri*.

7.19 Inmovilización de extracto enzimático crudo

Con la finalidad de utilizar el extracto crudo obtenido a partir de la cepa de *Staphylococcus sp.* como biocatalizador se inmovilizó en alginato de sodio al 3% obteniendo perlitas de un diámetro de 0.5 a 2 mm y un peso de 0.2 g (Fig. 63). Se determinó que un tiempo de reposo de 30-60 min en solución de CaCl_2 permitía obtener perlitas con una resistencia adecuada a las pruebas de temperatura óptima, reusabilidad y resistencia a metanol.

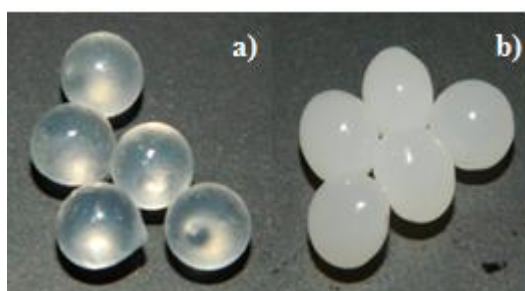


Fig. 63 Perlitas de alginato. a) Sin sobrenadante, b) Con sobrenadante.

Una vez obtenidas, se utilizaron 2 temperaturas de almacenamiento (Fig. 64) a 0 y 21 días con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de retención de actividad enzimática. Se obtuvieron valores de 83.1% por medio de la conservación a 4°C no mostrando diferencia contra el almacenamiento a 25 °C que retuvo un 76.1% de actividad lipolítica al finalizar el ensayo.

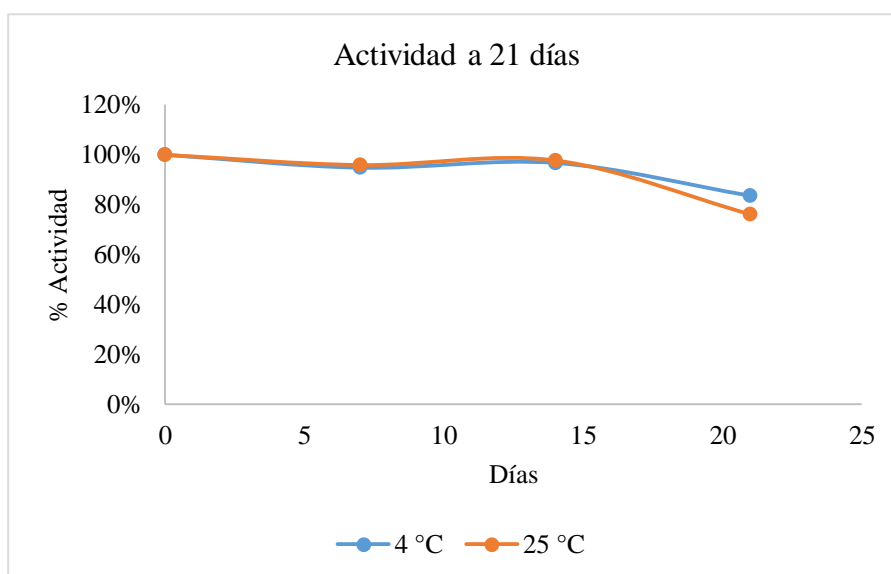


Fig. 64 Almacenamiento de actividad lipolítica

Dado que el biocatalizador debe presentar características muy particulares ya que será presentado a una reacción de transesterificación, se realizaron pruebas para determinar temperatura de acción óptima.

Se logró obtener un aumento en la tolerancia a la temperatura utilizando el sobrenadante inmovilizado mostrando retención de actividad a 60 °C comparado con el extracto libre (Fig. 65). Adicionalmente se determinó su estabilidad térmica hasta por 4 h denotándose de nuevo el mismo comportamiento hacia el aumento de temperatura (Fig. 66).

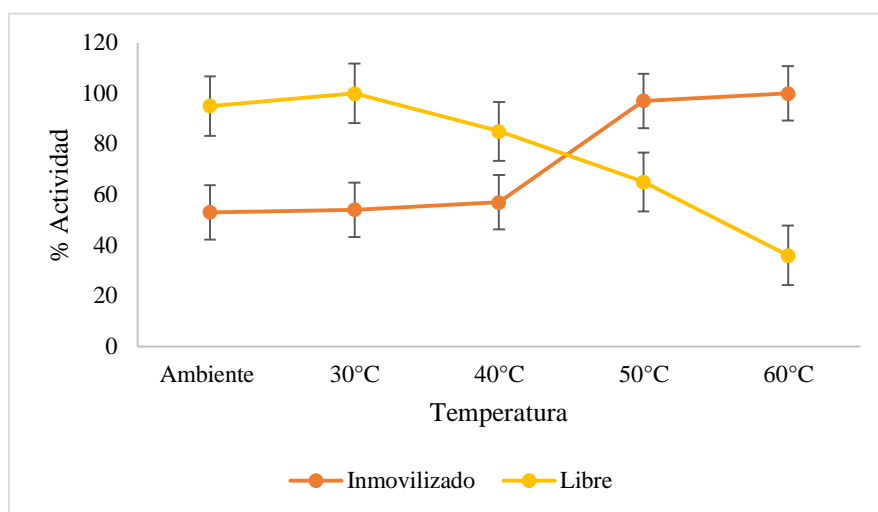


Fig. 65 Temperatura óptima

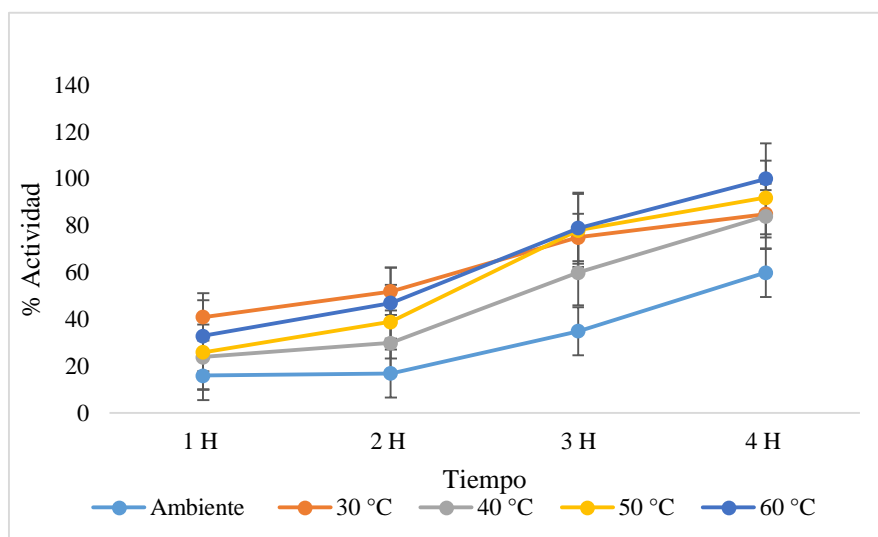


Fig. 66 Estabilidad térmica

Finalmente se evaluaron parámetros de reusabilidad de las perlitas mostrando una retención de actividad del 30% al tercer ciclo. Numerosas enzimas han sido inmovilizadas en polisacáridos, dentro de las que se incluyen las lipasas y lacasas (Hertzberg, et al. 1992) y considerando que las lipasa son utilizadas para numerosos procesos industriales, el hecho de que posean características como tolerancia a altas temperaturas sin perder su estructura es de gran importancia. Se observó un aumento en la tolerancia a la temperatura comparando el extracto libre contra el extracto inmovilizado lo que podría explicarse por la creación de microambientes mediante inmovilización; permitiendo que se prevenga la formación de patrones de enlaces de hidrógeno, lo que conlleva a que la desnaturalización sea evitada y a su vez su estabilidad vaya en aumento (Ghamgui et al. 2004; Kumar et al. 2014).

7.20 Transesterificación enzimática

Se realizaron ensayos de transesterificación enzimática en frascos de 50 mL utilizando muestras de 10 g de AVR de la empresa E2, se determinó utilizar solamente muestras de esta empresa por la estabilidad presentada en su índice de acidez y dado que a partir de ella se obtuvieron los rendimientos más elevados utilizando transesterificación química. Se realizó un diseño experimental considerando 5 concentraciones de perlitas de alginato con extracto crudo partiendo de 10% a 50% en base al peso del AVR, 5 temperaturas (ambiente, 30°C, 40°C, 50°C y 60°C), un tiempo de reacción de 96 h, una relación molar de 10:1 y 15% de agua. Se siguieron 2 estrategias de adición de metanol; adición única a la hora 0 y adición fraccionada cada 24 h iniciando en la hora cero. Se utilizó como control perlitas de alginato sin sobrenadante.

Los resultados obtenidos de ensayos con temperaturas menores a 40 °C no arrojaron producción de biodiesel dado que el aceite no pudo formar una capa uniforme con el agua y el metanol añadido lo que provocó que las perlitas no pudieran difundirse sobre la columna de reacción.

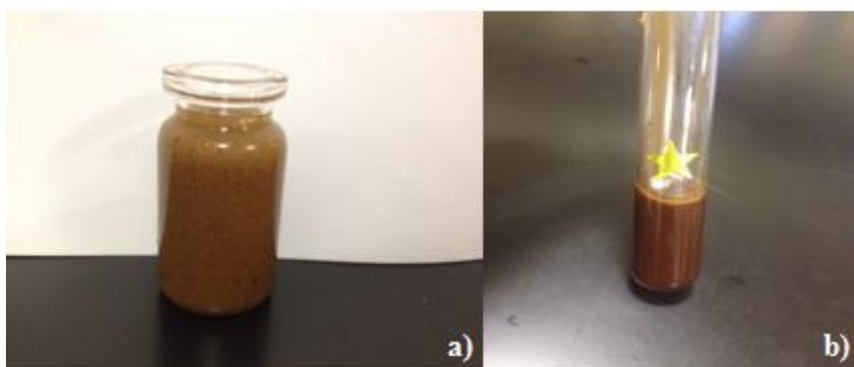


Fig. 67 Muestra de aceite sin reaccionar

Se obtuvo el mayor rendimiento en producción de biodiesel a 40°C, con una adición escalonada de metanol y 50% de carga de perlitas con un volumen de 8.16 mL equivalentes al 62% (Fig. 68).



Fig. 68 Muestra de biodiesel-agua

En las reacciones realizadas a 50°C y 60 °C la producción de biodiesel comenzó a decaer drásticamente con porcentajes de producción del 12% y del 0.09% respectivamente (Fig. 69).



Fig. 69 Muestra de biodiesel-aceite.

La veracidad de las muestras de biodiesel obtenidas se analizó por medio de FTIR donde se buscaron los picos característicos indicativos de formación de metil ésteres (Fig. 70).

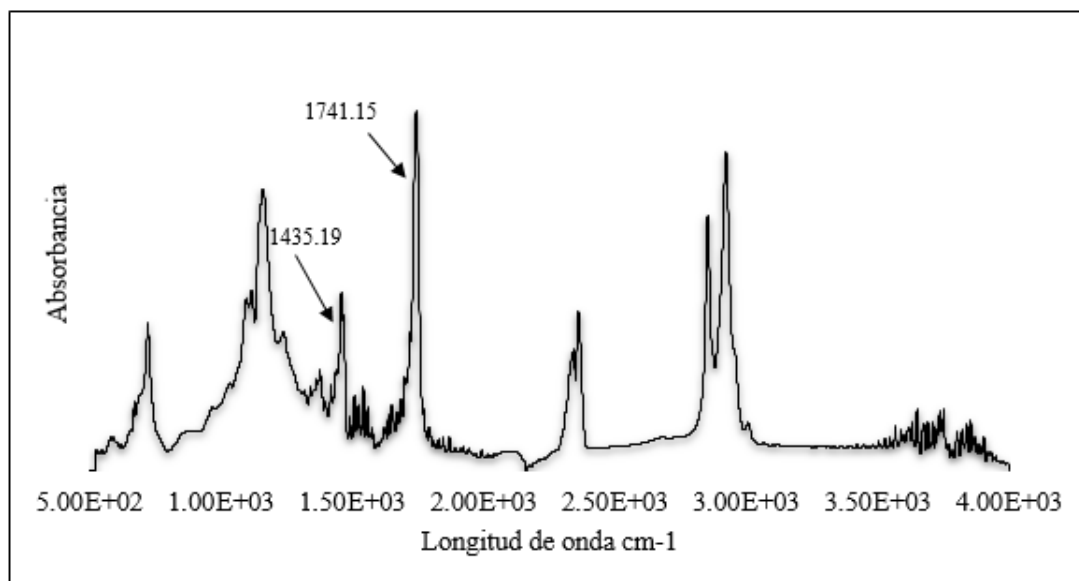


Fig. 70 FTIR Muestras de biodiesel obtenidas por transesterificación enzimática

La obtención del máximo rendimiento de biodiesel bajo las características establecidas utilizando transesterificación enzimática si bien dio un rendimiento más bajo que el método de transesterificación química debe exaltarse que se utilizó un extracto enzimático crudo y como materia prima una fuente de desecho.

Los resultados obtenidos muestran a la utilización de lipasas como una opción real al ser capaces de trabajar con materias primas con alto contenido de AGL (presentes en gran medida en los AVR) y poder lograr su conversión a metil ésteres además que mediante su inmovilización pueden ser reutilizadas (Al-Zuhair, 2008).

Analizando los componentes de la reacción; la adición de agua a la misma es necesaria, se decidió agregar en un 15% en relación al peso del AVR dado que la enzima requiere una interfase lípido-agua sobre la cual funcionar y dado que un exceso en la cantidad de agua presente en la muestra puede favorecer a la hidrólisis, éste es un parámetro que debe controlarse (Fukuda et al. 2001).

Respecto a la temperatura de reacción, a más altas temperaturas se ha observado una transformación más rápida; sin embargo temperaturas muy elevadas pueden conllevar a la desnaturalización de la enzima. Los resultados arrojaron que a 40 °C se obtiene el

mayor rendimiento lo que concuerda con lo observado por Nie et al. (2006) y Kuan et al. (2013) y Ugur et al. (2014) observando a su vez un menor rendimiento al elevar estas temperaturas.

Finalmente se siguieron 2 estrategias para la incorporación de metanol en la reacción de transesterificación, al observarse la desactivación de la reacción al añadir el metanol en una aplicación única se optó por realizar una adición escalonada en 4 ocasiones durante el tiempo de duración de la reacción lo que permitió la viabilidad de la misma. Si bien un exceso de metanol en el sistema puede inactivar la capacidad catalítica de la enzima, es necesaria su adición ya que la reacción de transesterificación requiere en teoría un radio molar de 3:1 y siguiendo esta estrategia se permite que el sistema no presente saturación pudiendo elevar el radio molar a 10:1 indicando la tolerancia al metanol del extracto utilizado en la transesterificación. Se confirmó la identidad de las muestras obtenidas por FTIR (Fig. 70) observando los picos característicos para los grupos carbonilo a 1745 cm^{-1} y metil ester a 1435 cm^{-1} (Bradley, M., Appl. Note).

8. Conclusiones

- Se logró la obtención de biodiesel por medio de transesterificación química utilizando ambos catalizadores (NaOH y KOH); se eligió al KOH como mejor catalizador al obtener rendimientos superiores utilizando un rango de concentración de 1-1.5%.
- Se determinaron las condiciones óptimas para las 3 muestras trabajadas (E1, E2 y E3) determinando una temperatura de reacción de 60 °C, una velocidad de agitación de 500 rpm, una relación molar óptima en el rango de 10:1-15:1, una concentración de catalizador en un rango de 1-1.5% con rendimientos finales de 66.4% para E1, 85.53% para E2 y 81.1% para E3. Las características de calidad de las muestras obtenidas se encontraron dentro los límites establecidos en las normas internacionales hasta por 12 meses de almacenamiento.
- Se trabajaron 2 métodos de lavado de muestras de biodiesel: lavado por burbujeo y lavado por agitación, siendo éste último el cual presentó un menor porcentaje de pérdida en % de volumen de muestra.
- Se obtuvieron 100 aislados a partir de muestras de suelo impactadas con aceite vegetal residual, 76 bacterias y 24 hongos; a las cuales se les determinó su actividad lipolítica, obteniendo un total de 38 cepas bacterianas y 14 cepas fúngicas positivas.
- Se determinó la actividad lipolítica de extractos crudos, paquete celular y liofilizados. Obteniendo la mayor actividad (480 UI/L) del extracto crudo bacteriano obtenido a partir de la cepa 12.
- Se identificó molecularmente a la cepa 12 mediante secuenciación de gen 16S rRNA obteniendo el género *Staphylococcus sp.*
- Se logró inmovilizar el extracto crudo en alginato al 3% y realizar la transesterificación enzimática obteniendo un rendimiento final de 62% a 40 °C, con una relación molar de 10:1, 15% de agua y 96 horas de reacción.

9. Perspectivas

- Realizar la optimización de parámetros para producción de biodiesel utilizando transesterificación enzimática.
- Realizar la identificación molecular de los aislados que presentaron actividad lipolítica.
- Establecer metodologías para la determinación de otras actividades enzimáticas de importancia biotecnológica.

Literatura citada

1. Abada, EAE. 2008. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus steaerothermophilus* AB-1. Pakistan Journal of Biological Sciences 11:1100-1106.
2. Abbaszadeh A, Ghobadian B, Najafi G y Yusaf T. 2014. An experimental investigation of the effective parameters on wet washing of biodiesel purification. International Journal of Automotive and Mechanical Engineering. 9:1525-1537. DOI: <http://dx.doi.org/10.15282/ijame.9.2013.4.0126>
3. Adinarayana K, Bapi Raju, KVVSN, Zargar, MI, Devi, RB, Lakshmi, PJ y Ellaiah, P. 2004. Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species, Indian Journal of Biotechnology 3:65-69
4. Agbajelola DO, Musa U, Mohammed IA, Suleiman B, Asika PU. 2015. Optimization and characterization of biodiesel synthesis from chicken fat. Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology 2(7):1931-1935.
5. Aguillón Martínez, JE, Islas J, Martínez A, Riegelhaupt E. 2010. Bioenergía: estado del arte y perspectivas tecnológicas en: Energías Alternas: Propuesta de investigación y desarrollo tecnológico para México. Academia Mexicana de Ciencias. Pág. 44.
6. Ahmad M, Ahmed S, Hassan FU, et al. 2010. Base catalyzed transesterification of sunflower oil biodiesel. African Journal of Biotechnololy 9:8630–8635.
7. Akoh, CC, Chang S, Lee G, y Shaw J. 2007. Enzymatic approach to biodiesel production. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55:8995-9005. DOI: 10.1021/jf071724y

8. Al-Zuhair S. Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil using lipase. 2008. The open chemical engineering journal. 2:84-88.
9. Alatorre Frenk C. 2009. Energías Renovables para el Desarrollo Sustentable en México 2009. SENER. México D. F. Pág. 11.
10. Alford JA, y Steinle EE, 1967, Journal of Applied Bacteriology 30:488
11. Ali Y, Hanna MA y Cuppett SL. 1995. Fuel Properties of Tallow and Soybean Oil Esters. Journal of the American Oil Chemists' Society. 72(12):1557-1564.
12. Álvarez Maciel C. 2009. Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. Economía informa 359:63-65, 83-85.
13. Alvis Bermúdez A, Vélez Pasos C y Arrázola Paternina G. Efecto de las condiciones de freído sobre la pérdida de humedad y ganancia de aceite en trozos de ñame (*Dioscorea alata*). Ingeniería e Investigación. 30(1): 41-44.
14. Amara AA, Salem SR y Shabeb MSA. 2009. The Possibility to Use Bacterial Protease and Lipase as Biodetergent. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 4 (2):104-114. ISSN 2078-466X
15. Antczak MS, Kubiak A, Antczak T y Bielecki S. 2009. Enzymatic biodiesel synthesis-key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy. 34:1185-1194. DOI: 10.1016/j.renene.2008.11.013
16. Arroyo, M. 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharmaceutica. 39 (2): 23-39.
17. Arun N, Sampath M, Siddharth S y Prasaanth RA. 2011. Experimental Studies of base catalyzed transesterification of Karanja oil. International journal of energy and environment. 2: 351–356.

18. ASTM D6423-14. 2014. Standard Test Method for Determination of pH of Denatured Fuel Ethanol and Ethanol Fuel Blends. ASTM International, West Conshohocken, PA. DOI: 10.1520/D6423-14.
19. ASTM D1298-12b. 2012. Standard Test Method for Density, Relative Density, or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer Method. ASTM International, West Conshohocken, PA, , DOI: 10.1520/D1298-12B
20. ASTM D664-11a. 2011. Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration. ASTM International, West Conshohocken, PA.
21. ASTM D2500-11. 2011 Standard Test Method for Cloud Point of Petroleum Products. ASTM International, West Conshohocken, PA. DOI: 10.1520/D2500-11
22. ASTM D97-12. 2012. Standard Test Method for Pour Point of Petroleum Products. ASTM International, West Conshohocken, PA. DOI: 10.1520/D0097-12
23. ASTM D1796-11e1. 2011. Standard Test Method for Water and Sediment in Fuel Oils by the Centrifuge Method (Laboratory Procedure). ASTM International, West Conshohocken, PA. DOI: 10.1520/D1796-11.
24. Aysun A. 2009. Isolation and identification of a lipase producing psychrotrophic bacteria from soil: cloning and partial characterization of its lipase. [Thesis]
25. Bacovsky D, Korbitz W, Mittelbach M y Worgetter M. 2007. Biodiesel Production: Technologies and European Providers. IEA, Task 39 Report T39-B6, Graz, Austria, p: 104.
26. Balaji, V y Ebenezer P. 2008. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. Indian Journal of Science and Technology. 1: 1-8

27. Balcao VM, Paiva AL y Malcata FX. 1996. Bioreactors with immobilized lipas: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*. 18:392-416.
28. Bandmann N, Collet E, Leijen J, Uhlen M, Veide A y Nygren P. 2000. A Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *Journal of Biotechnology*. 79: 161-172. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00224-8
29. Barberis, S, Guzman F y Illanes A. 2008. Study Cases of Enzymatic Processes. In: *Enzyme Biocatalysis-Principles and Applications*. (1st Edn.), Illanes, A. (Ed.). Springer Science Press, New York. 293-296. ISBN: 978-1-4020-8360-0.
30. Bartasun P, Cieslinski H, Bujacz A, Wierzbicka-Wos A y Kur J. 2013. A study on the interaction of Rhodamine B with Methylthioadenosine Phosphorylase protein sourced from an Antarctic soil metagenomic library. *PLoS ONE*. 8(1), p.e55697.
31. Behzadi S, Farid MM. 2007. Review: examining the use of different feedstock for the production of biodiesel. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2:480-486.
32. Benjumea P, Agudelo JR, Zapata AP y Mendoza RE. 2003. Biodiesel: Una revisión del proceso de obtención mediante la transesterificación de aceites vegetales. *Revista Energética*. No. 29. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Págs. 9-18.
33. Berrios M y Skelton RL. 2008. Comparison of purification methods for biodiesel. *Chemical Engineering Journal*, 144, 459-465.
34. Bhosle BM y Subramanian R. 2005. New approaches in deacidification of edible oils-a review. *Journal of Food Engineering*, 69:481-494
35. Bier, M. 1955. en *Methods in Enzymology* 1:627

36. Biodiesel Uruguay. 2006. Rendimiento de cultivos oleaginosos por hectárea aptos para biodiesel. [Online]. Disponible en: <http://www.biodiesel-uruguay.com/articulos/uy-5.php>
37. Biomaas Research. 2013. Biomass research report 1301 Analysing the effect of biofuel expansion on land use in major producing countries: evidence of increased multiple cropping. [Online]. Disponible en: http://www.biomassresearch.eu/Biomass%20Research%201301_Analysing%20the%20effect%20of%20biofuel%20expansion%20on%20land%20use.pdf
38. Biopact. 2007. Captación y almacenamiento de carbono: los biocombustibles de cuarta generación. [Online]. Disponible en: http://www.iber cib.es/info_noticia/carbon-capture-and-storage-the-fourth-generation-biofuels.aspx
39. Biotransformation Plou Laboratory. Immobilization of enzymes. [Online]. Disponible en: <http://www.franciscoploulab.eu/p/research-lines.html>.
40. Boatella J y Codony R. 2000. Recycled Cooking Oils: Assessment of risk for public health Luxembourg. European Parliament. Directorate General for Research.
41. Bradley M. Application Note: 51258. Biodiesel (FAME) Analysis by FT-IR. Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA.
42. Brena BM y Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes A Literature Survey. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition Edited by: J. M. Guisan © Humana Press Inc., Totowa, NJ
43. Caldwell BA, Castellano MA y Griffith RP. 1991 Fatty acid esterase production by ectomycorrhizal fungi. Mycologia 83: 233-236.
44. Canacki M. 2007. The potential of Restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. Bioresource Technology. 98 (1):183-190.

45. Canacki M y Van Gerpen J. 2001. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. Transactions of the ASAE American Society of Agricultural Engineers 44(6):1429–1436.
46. Cao L. 2005. Carrier-bound immobilized enzymes. Principles, application and design Wiley-VCH, Weinheim. ISBN-10: 3-527-31232-3
47. Cardona Alzate CA. 2009. Perspectiva de la producción de biocombustibles en Colombia: contextos latinoamericano y mundial. Revista de ingeniería. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia. Pág. 113.
48. Carter D, Darby D, Halle J y Hunt P. 2005. How to Make Biodiesel; Low-Impact Living Initiative. Redfield Community, Winslow, Bucks. ISSN 0-9649171-0-3.
49. Carissimi M, Ottonelli Stopiglia CD, Furtado de Souza T, Corbellini VA, Scroferneker ML. 2007. Comparison of lipolytic activity of *sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-rhodamine b and tween 80. TECNO-LÓGICA. Santa Cruz do Sul. 11(1): 33-36.
50. Castro-Ochoa LD, Rodríguez-Gómez C, Valerio-Alfaro G, Oliart Ros R. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Enzyme and Microbial Technology 37: 648–654. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.06.003
51. Cayli G, Küseföglü S. 2008. Increased yields in biodiesel production from used cooking oils by a two-step process: Comparison with one step process by using TGA. Fuel Processing Technology 89(2): 118-122.
52. Cerveró JM, Coca J y Luque S. 2008. Production of biodiesel from vegetable oils. Grasas Y Aceites. 59 (1): 76-83.

53. Chandler IC. 2001. Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions. Journal of the American Oil Chemists' Society. 78: 737-742. DOI: 10.1007/s11746-001-0335-7.
54. Chang Chang R y Jei-Fu Shaw. 1987. The immobilization of *Candida cylindracea*. Botanical Bulletin of Academia Sinica 28: 33-42.
55. Chen G, Ying M, y Li W. 2006. Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel - Biodiesel. Applied Biochemistry and Biotechnology Journal. 132 (1-3):911-921.
56. Chhetri BA, Watts CK, Rafiqul Islam M. 2008. Waste cooking oil as an alternative feedstock for biodiesel production. Energies. 1:3-18. DOI: 10.3390/en1010003
57. Crespo G, Martínez M, Aracil J. 2001. Biodiesel: una alternativa real al gasóleo mineral. Ingeniería Química. Marzo. 135-145.
58. Cole JR, Wang Q, Chai B y Tiedje JM. 2011. The Ribosomal Database Project: sequences and software for high-throughput rRNA analysis. In F.J. de Bruijn (ed), Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches, J. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
59. Connemann J y Fischer J. 1998. Biodiesel in Europe 1998: biodiesel processing technologies. International Liquid Biofuels Congress, Curitiba – Paraná-Brazil, July 19-22, 1-16.
60. Cvengros JJ y Cvengrosová Z. 2004. Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids. Biomass Bioenergy. 27(2): 173-181.
61. Dana R. 2009. Biodiesel. Do-it-yourself production basics. ATTRA. Págs. 1-12.

62. De Paola MG, Ricca E, Calabro V, Curcio S y Iorio G. 2009. Factor analysis of transesterification reaction of waste oil for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 100 (21): 5126-5131.
63. Dinorín-Tellez Girón J., de la Cerna Hernández C. y López y López V. 2009. Aislamiento y selección de microorganismos productores de lipasas a partir de suelos. En Congreso nacional de biotecnología y bioenergía. VII simposio internacional de producción de alcoholes y levaduras. (SIPAL).
64. Dinorín-Tellez Girón J., Ríos Leal E., Rojas Chávez C., et. al. 2010. Transesterificación de aceites de desecho con metanol utilizando células completas de *Pseudomonas aeruginosa* como catalizador. En XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. 24-26 de Marzo. Acapulco, México. Págs. 1-5.
65. Dizge NB Keskinler y Tanriseven A. 2009. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal* 44: 220-225. DOI: 10.1016/j.bej.2008.12.008
66. Dossat V, Combes D, Marty A. 2002. Lipase-catalyzed transesterification of high oleic sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*. 30(1): 90-94.
67. Drapcho CM, Nhuan NP, Walker TH. 2008. *Biofuel Engineering Process Technology*. New York:McGraw-Hill.
68. D'Souza SF. 1989. Immobilized cells: techniques and applications. *Indian Journal of Microbiology*. 29: 83-117
69. Du W, Li W, Sun T, Chen X y Liu D. 2008. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79: 331-337. DOI: 10.1007/s00253-008-1448-8

70. EBB (European Biodiesel Board). 2007. EBB official press release: 2006, 2007 production and capacity statistics. [Online]. Disponible en: <http://www.ebb-eu.org/EBBpress.php>
71. Energía 12. 2012. Plantas de producción de biodiesel en Argentina. [Online] Disponible en: <http://energia12.com/2012/11/13/plantas-de-produccion-de-biodiesel-enargentina/>
72. Encinar JM, Juan F, Gonzalez JF y Rodriguez-Reinares A. 2007. Ethanolysis of used frying oils: Biodiesel preparation and Characterization. *Fuel Processing Technology*. 88 (5): 513-522.
73. Feizollahnejad, M., & Ghobadian, B. 2008. Modification of biodiesel processor washing vessel. (MSc Thesis), Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
74. Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernandez-Lorente G y Guisan JM. 1998. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1-2(93): 185-197. DOI: 10.1016/S0009-3084(98)00042- 5
75. Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. 2009. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*. 102(5): 1298-315.
76. Focke WW, Westhuizen I, Grobler ABL, Nshoane KT, Reddy JK y Luyt AS. 2012. The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. *Fuel* 94: 227–233.
77. Frayer TT, Lawrence RC, Reiter B. 1967. *Journal of dairy science*. 50: 477.

78. Freedman B, Pryde EH y Mounts TL. 1984. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 61(10): 1638-1643.
79. Fukuda H, Kondo A y Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5): 405-416, ISSN 1389-1723
80. Fukuda H, Hama S, Tamalampudi S y Noda H. 2008. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends in Biotechnology*, 26(12): 668-673.
81. Fukuda H, Kondo A y Tamalampudi S. 2009. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*. 44: 2-12. DOI: 10.1016/S1389- 1723(01)8028 8-7
82. Gandarilla Pacheco FL. 2012. Evaluación de aislados nativos de hongos entomopatógenos de zonas citrícolas sobre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Universidad Autónoma de Nuevo León. [Tesis]
83. García Camús JM, García Laborda JA. 2006. Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol. CEIM. Dirección General de Universidades e Investigación. Pág. 32.
84. Ghaly AE, Dave D, Brooks MS y Budge S. 2010. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6 (2): 54-76.
85. Ghamgui H, Chabauni KM y Gargouri Y. 2004. 1-butyle oleate syntehsis by immobilized lipase from rhizopues orizae: A comparative study between n-hexane and solvet-free system. *Enzyme Microb Technol*. 35: 355-363
86. Godtfredsen SE. 1990. Microbial Lipases. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Fogarty, W.M. and E.T. Kelly (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 255-274.

87. Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP y Davidson WS. 1996. Microbial lipases: Productions and applications. *Science progress*. 79: 119-157.
88. Gnanaprakasam A, Sivakumar VM, Surendhar A, Thirumarimurugan M, and Kannadasan T. 2013. Recent Strategy of Biodiesel Production from Waste Cooking Oil and Process Influencing Parameters: A Review. *Journal of Energy*, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/926392>
89. Guerrero Fajardo CA, Osorio León ID y Sierra Vargas FE. 2010. Evaluating the effect of temperature on biodiesel production from castor oil. *Ingeniería e Investigación* 30(2): 52-61.
90. Guncheva M y Zhiryakova D. 2011. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1): 1-21. DOI:10.1016/j.molcatb.2010.09.002
91. Gupta R, Gupta N y Rathi P. 2004. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64(6): 763-781
92. Gupta M y Mattiasson B. 1992 Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems. In: *Methods of Biochemical Analysis*. 36: 1–34. DOI: 10.1002/9780470110577.ch1
93. Gupta N, Rathi P y Gupta R. 2002 Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry* 311(1): 98–99.
94. Hass MJ. 2005. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstock: vegetable oil soapstock. *Fuel process technology*. 86(10): 1087-1096.

95. Haas M.J, McAloon AJ, Yee WC y Foglia TA. 2006. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresource Technology*. 97(4): 671-678.
96. Hama S, Yamaji H, Kaieda M, Oda M, Kondo A, y Fukuda H. 2004. Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production. *Biochemical. Engineering Journal*. 21(2): 155-160.
97. Hameed NA. 1997. Production of lipase by certain strain and effect of some additives to the growth medium. *Journal of microbiology*. 31(2): 139-154.
98. Hazell P y Pachauri RK. 2006. Bioenergía y agricultura: promesas y retos. IFPRI. Resumen 1.
99. Heipieper HJ y De Bont JA. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(12): 4440–4444.
100. Hertzberg S, Kvittingen L, Anthonsen T. y Skjak Braek G. 1992. Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: application in lipase-catalysed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(1): 42–47.
101. Highina BK, Bugaje IM, y Umar B. 2011. Biodiesel production from *Jatropha caucous* oil in a batch reactor using zinc oxide as catalyst. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation* 1(2): 146–149.
102. Hilbert JA y Migone MB. 2008. Empleo de los biocombustibles en motores diesel. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Uruguay. Octubre. Págs. 1-12.
103. Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S y Douglas T. 2006. Enviromental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and

- ethanol biofuels. Proceedings of the National Academy of Sciences. 30(103): 11206-11210.
104. Homer I, Hunter E .2014. Comparison of different artisan methods to obtaining biodiesel. International Journal of Science Environment and Technology 3:33–47.
105. Hou CT y Johnston TM. 1992. Screening of Lipase Activities with Cultures from the Agricultural Research Service Culture Collection. Journal of the American Oil Chemists' Society. 69(11): 1088-1097.
106. Houde A, Kademi A y Leblanc D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. Applied Biochemistry and Biotechnology. 118(1): 155-170.
107. Hossain ABMS y Mazen MA. 2010. Effects of catalyst types and concentrations on biodiesel production from waste soybean oil biomass as renewable energy and environmental recycling process. Australian Journal of Crop Science. 4(7): 550-555.
108. Hwan Lee D, Park CH, Yeo JM y Kim SW. 2006. Lipase Immobilization on Silica Gel Using a Cross-linking Method. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 12 (5): 777-782.
109. IAASTD. 2009. Bioenergía y biocombustibles: oportunidades y limitaciones. [Online]. Disponible en: <http://www.agassessment.org/docs/bioenergyESlowres.pdf>
110. Iftikhar T, Niaz M, Ul-Haq I y Rajoka MI. 2008. Maximization of intracellular lipase production in a lipase-overproducing mutant derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: A Kinetic Study. Food Technology and Biotechnology 46(4): 402-412. ISSN:1330-9862

111. Islas Sampiero J y Jiménez Martínez A. 2009. La bioenergía: oportunidades y retos tecnológicos. *Ide@s CONCYTEG*. Año 4(54): 1185-1197
112. Issariyakul T, Kulkarni MG, Dalai AK y Bakhshi NN. 2007. Production of biodiesel from waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system. *Fuel Processing Technology*. 88(5): 429-436.
113. Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Van Heuvel M y O. Misset. 1994. Bacterial Lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 15(1): 29-63.
114. Jaeger KE, Dijkstra BW y Reetz MT. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three- dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews of Microbiology*. 53: 315-351.
115. Jegannathan KR, Abang S, Poncelet D, Chan ES y Ravindra P. 2008. Production of biodiesel using immobilized lipase-A critical review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 28(4): 253-264. DOI: 10.1080/07388550802428392
116. Jin G y Biernma JT. 2010. Whole-cell biocatalysts for producing biodiesel from waste greases. *Illinois Sustainable Technology Center Reports*. Pág.2.
117. Joseph B, Ramteke PW y Thomas G. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*. 26(5): 457-470. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.05.003
118. Kaieda M, Samukawa T, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, Shimada Y, NodaH, Nomoto F, Ohtsuka K, Izumoto E y Fukuda H. 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(6):627–631.

119. Kang L y Wang R. 2013. Biodiesel production by transesterification of duck oil with methanol in the presence of alkali catalyst. *Petroleum & Coal* 55(1): 68-72. ISSN 1337-7027
120. Karanam SK y Medicherla NR. 2008. Enhanced lipase production by mutation induced *Aspergillus japonicus*. *African Journal of Biotechnology*. 7(12): 2064-2067.
121. Kashmiri MA, Adnan A y Butt BW. 2006. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *African Journal of Biotechnology* 5(10): 878-882.
122. Klibanov, A.M., 1983. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*. 219(4585): 722-727. DOI: 10.1126/science.219.4585.722
123. Kim H, Sung M, Kim M y Oh T. 1994. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp strain 398. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 58(5): 961-962.
124. Kim EK, Jang WH, Ko JH, Kang JS, Noh MJ, Yoo OJ. 2001. Lipase and Its Modulator from *Pseudomonas* sp. Strain KFCC 10818: Proline-to-Glutamine Substitution at Position 112 Induces Formation of Enzymatically Active Lipase in the Absence of the Modulator. *J. Bacteriol.* 183(20): 5937–5941.
125. Köse O, Tuter M y Aksoy HA. 2002. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technology*. 83(2): 125-129. DOI: 10.1016/S09 60-8524(01)00203-6
126. Kouker G, Jaeger KE. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(1): 211–213.

127. Krishna SH y Karanth NG. 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reaction in nonaqueous media. *Catalysis Reviews: Science and Engineering*. 44(4): 499-591.
128. Kulkarni MG y Dalai AK. 2006. Waste cooking oil-an economical source for biodiesel: A review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 45(9): 2901-2913.
129. Kumar TA, Kumar A y Raheman H. 2007. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass Bioenergy*. 31(8): 569-575. doi:10.1016/j.biombioe.2007.03.003m
130. Kumar D, Lalit K, Sushil N, Chand R, Rajinder P, Gupta VK. 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch. Appl. Sci. Res* 4(4): 1763-1770.
131. Kumar S, Yadav RK y Negi S. 2014. A comparative study of immobilized lipase produced from *Penicillium chrysogenum* SNP5 on two different anionic carriers for its pH and therstability. *Indian Journal of Biotechnology*. 13: 301-305.
132. Kurki A, Hill A y Morris M. 2006. Biodiesel: The sustainability dimensions. ATTRA Publication #IP281. 1-12.
133. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ y Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
134. Lawrence RC, Fryer TF, Reiter BJ. 1967. *Gen. Microbiol.* 48.

135. Lean, G. 2007. Oil and gas may run short by 2015. The independent, UK. [Online] Disponible en: <http://www.independent.co.uk/environment/climate-change/oil-and-gas-may-run-short-by-2015-say-industry-experts-458227.html>
136. Lee MY y Dordick JS. 2002. Enzyme activation for nonaqueous media. *Current Opinion in Biotechnology*. 13(4): 376-384.
137. Lee GH, Bae JH, Suh MJ, Kim IH, Hou CT y Kim HR. 2007. New finding and optimal production of a novel extracellular alkaline lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178. *J Microbiol Biotechnol*. 17(6):1054-7
138. Lee I, Johnson LA y Hammond EG. 1995. Use of Branched-Chain Esters to Reduce the Crystallization Temperature of Biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 72(10): 155-160.
139. Lee DW, Park Y y Lee K. 2009. Heterogeneous base catalysts for transesterification in biodiesel synthesis. *Catalysis Surveys from Asia*. 13: 63-77.
140. Letunic I y Bork P. 2007 Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylo-genetic tree display and annotation. *Bioinformatics*. 23(1):127-128.
141. Leung DY, Wu X y Leung MKH. 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied energy*. 87(4): 1083-1095.
142. Leung, DY y Guo Y. 2006. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*. 87(10): 883–890. DOI: 10.1016/j.fuproc.2006.06.003

143. Li NW, Zong MH y Wu, H. 2009. Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. *Process Biochemistry*. 44(6): 685-688.
144. Li W, Du W y Liu D. 2007. *Rhizopus oryzae* Whole-Cell-Catalyzed Biodiesel Production from Oleic Acid in tert-Butanol Medium. *American Chemical Society. Energy and fuels*. 22(1). DOI: 10.1021/ef700624v
145. Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG and Grasselil JG. (1991) *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, New York, NY, Academic Press Inc.
146. Lípidos. s/a. [Online]. Disponible en: <http://centros.edu.xunta.es/iesastelleiras/depart/bioxeo/pres2b/plipid.pdf>
147. Lobo I. 2008. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Nature Education* 1(1): 215.
148. López G. (2006). Biodiesel: perfiles de negocios. *Internacional red IV. CYTED*.
149. Lotero E, Liu Y, Lopez DE, Suwannakarn K, Bruce DA y Goodwinn J G. 2005. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 44(14): 5353-5363.
150. Lu J, Nie K, Xie F, Wang F y Tan T. 2007. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. *Process Biochemistry*, 42(9): 1367–1370. doi:10.1016/j.procbio.2007.06.004
151. Ma F, Clements LD y Hanna MA. 1998. Biodiesel fuel from animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 37(9): 3768-3771. DOI: 10.1021/ie980162s

152. Macrae AR. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists'* 60: 291-294. DOI: 10.1007/BF02543502.
153. Malcata, FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill CG y Amundson CH. 1990. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. *Journal of the American Chemical Society*. 67(12): 890-910. DOI: 10.1007/BF02541845
154. Manual de biocombustibles. Asociación regional de empresas de petróleo y gas natural en Latinoamérica y el Caribe (ARPEL). Pág 75. [Online] Disponible en: http://books.google.com.mx/books?id=a2HH8c2IDUYC&pg=PA75&dq=biocombustibles+de+primera+generacion&hl=es&ei=jUyaTtiKDIG88gbRwvyHAg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCsQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false
155. Marchetti, JM, Miguel VU y Errazu AF. 2008. Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*. 89(8): 740-748. DOI: 10.1016/j.fuproc-2008-01-007
156. Martinelle M, Holmquist M y Hult K. 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1258(3):272-276.
157. Masera Cerutti O, Rodríguez Martínez N, Lazcano Martínez I, Horta Nogueira LA y Macedo CI et. al. 2006. Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el transporte en México. SENER. ISBN 970-9983-14-8. Pág. 12.

158. Masson SL. Criterio de calidad para materias grasas utilizadas frecuentemente en la nutrición animal y de peces. [Online]. Consultado el 01/11/15. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/ab482s10.htm>
159. Matassoli ALF, Correa INS, Ortilho MF, Veloso CO y Langone MAP, 2009. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 155(1-3): 347-355. DOI: 10.1-7/s12010-008-8424-8
160. Math MC, Prem Kumar S y Chetty SV. 2010. Optimization of biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Indian Journal of Science and Technology* 3(3): 318-321. DOI: 10.17485/ijst/2010/v3i3/29707
161. Mattiasson, B. y Kaul R. 1991. Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology. *Bioprocess technology*. 14: 161–179.
162. Matsumoto T, Takahashi S, Kaieda M, Ueda M, Tanaka A, Fukuda H y Kondo A. 2001. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 57(4): 515-520.
163. Meher LC, Vidya Sagar D y Nai SN. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 10(3): 248-268. doi:10.1016/j.rser.2004.09.002
164. Meter F, Zarcula C y Kiss C. 2007. Enhancement of lipases enantioselectivity by entrapment in hydrophobic sol-gel materials: Influence of silane precursors and immobilization parameters. *Journal of Biotechnology*. 131(2). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.07.187

165. Miller C, Austin H, Posorske L y Gonzlez J. 1988. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J Am Oil Chem Soc* 65(6):927–931
166. Narasimharao, K., A. Lee and K. Wilson, 2007. Catalysts in production of biodiesel: A review. *J. Biobased Mater. Bioenergy*, 1: 19-30. DOI: 10.1016/jbmb.2007.002
167. Nascimento RSV, Soares VLP, Albinante S, Barreto LR (2005) Effect of ester-additives on the crystallization temperature of methyl hexadecanoate. *J Therm Anal Calorim* 79:249-254. doi:10.1007/s10973-005-0043-9
168. Nelson LA, Foglia TA y Marmer WN. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73(8): 1191–1195.
169. Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 43(1-4):142-147.
170. Nouredini H, Gao X y Philkana RS. 2004. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Papers in Biomaterials*. Paper 19.
http://digitalcommons.unl.edu/chemeng_biomaerials/19
171. NMX-F-101. Método de prueba para la determinación del índice de acidez en aceites y grasas vegetales o animales.
172. NMX-F-223-1985. Alimentos. Aceite vegetal comestible. Normas mexicanas. Dirección general de normas.

173. O'Donnell S, Demshemino I, Yahaya M, Nwadike I y Okoro L (2013) A review on the Spectroscopic Analyses of Biodiesel. *European International Journal of Science and Technology* 2:137-146.
174. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 2000. 969.33.
175. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 1990. 940.28.
176. Okumura S, Iwai M y Tsujisaka Y. 1979. *Biochem. Biophys. Acta* 575:156.
177. Öner C y Altun S. 2009. Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine. *Applied Energy*. 86(10): 2114–2120. doi:10.1016/j.apenergy.2009.01.005
178. Panalotov I. y Verger R. 2000. *Physical Chemistry of Biological Interfaces*. Marcel Dekker Inc., New York
179. Parker SK. *The Small Scale Biodiesel Test Manual*. A manual of quality control test methods for small scale and homebrew biodiesel. Dickinson College. Dickinson College Biodiesel.
180. Patel JB 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* 6:313-321.
181. Peled N y Krenz MG. 1981. *Anal Biochem.* 112 (2): 219-222.
182. Petersen SB y Drablos, F. 1994. in *Lipases: their Structure, Biochemistry and Application* (eds. Woolley, P. and Petersen, S. B.), Cambridge University Press UK. 23–48.

183. Pinto AC, Guarieiro LN, Rezende MJ, Ribeiro NM, Torres EA, Lopes, WA, Pereira P y Andrade JB. 2005. Biodiesel: An overview. Journal of the Brazilian Chemical Society. 16(6B): 1313-1330.

184. Pogori N, Xu Y y Cheikhyyoussef A. 2007. Potential Aspects of Lipases Obtained from *Rhizopus* Fungi. Research Journal of Microbiology, 2(2): 101-116.

185. Prabhakar T. et al. 2012. Studies on optimization of extracellular lipase from potential fungal strain(s) isolated from oil contaminated soil Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2(3): 418-425.

186. Pinsirodom P y Parkin KL. 2001. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Unit C3.1. Doi: 10.1002/0471142913.fac0301s00

187. Prugh T. 2014. Biofuel Production Declines. Vital signs Online trend. Worldwatch Institute. [Online]. Disponible en: <http://www.worldwatch.org/biofuel-production-declines-1>

188. Quispe Márquez JC. 2008. Los combustibles alternativos hoy. [Online] Disponible en: <http://www.biocombustibles244a.blogspot.com/>

189. Rabbani M, Bagherinejad MR Sadeghi HM, Shariat ZS, Etemadifar Z, Moazen F, Rahbari M, Mafakher L, Zaghian S. 2013. Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. Braz. J. Microbiol. 44(4): 1113-1119.

190. Radich A. 2006. Biodiesel performance, costs, and use. US Energy Information Administration, <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biodiesel/index.html>

191. Ramadhas AS, Jayaraj S y Muraleedharan C. 2004. Use of vegetable oils as IC engine fuels-a review. *Renewable energy*. 29(5): 727-742. doi:10.1016/j.renene.2003.09.008
192. Ramesh S, Kumar R, Agalya Devi R y Balakrishnan K. 2014. Isolation of a lipase producing bacteria for enzyme synthesis in shake flask cultivation. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 3(3): 712-719
193. Ranganathan SV, Narasimhan SL y Muthukumar K. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*. 99(10): 3975-3981. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.060
194. Rangel SX, García J y Orrego CE. 2011. Inmovilización de lipasa de *candida antarctica* sobre soportes de quitosano-gelatina. *Revista Colombiana de Química*. 40(2).
195. Regueiro, I. 2006. Historia de los biocombustibles Páginas 1-26
196. Reoil México. 2009. [Online] Disponible en: http://www.reoil.net/pdf/reoil_biodiesel_2009.pdf
197. Refaat AA, Attia NK, Sibak HA, El Sheltawy ST, El Diwani GI. 2008. Production optimization and quality assessment of biodiesel from waste vegetable oil. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 5(1): 75-82. ISSN: 1735-1472
198. Refaat AA. 2009. Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 6(4): 677-694.

199. Refaat AA. 2010. Different techniques for the production of biodiesel from waste vegetable oil. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 7(1): 183-213.
200. Rivas A. ABC del biodiesel. Biodiesel en Venezuela. [Online]. Disponible en: <http://www.abcbiodiesel.com.ve/index.htm>
201. Robles-Medina A, Gonzalez-Moreno PA, Esteban Cerdán L y Molina-Grima E. 2009. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*. 27(4): 398-408. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.008
202. Rodrigues Machado E, Marmesat S, Abrantes S y Dobarganes C. 2007. Uncontrolled variables in frying studies: differences in repeatability between thermoxidation and frying experiments. *Grasas Aceites* 58(3): 283-288.
203. Rojas González AF, Girón Gallego E y Torres Castañeda HG. 2010. Variables de operación en el proceso de transesterificación de aceites vegetales: una revisión - catálisis enzimática. *Ingeniería e investigación*. 30(1): 17-21.
204. Royon D, Daz M, Ellenrieder G y Locatelli S. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour Technol* 98(3):648–653.
205. Rubin B y Dennis EA. 1997. *Methods Enzymology: Lipases, Part A*. Academic Press, New York. 284: 3-154.
206. Ruckenstein E y Wang X. 1993. Lipase immobilized on hydrophobic porous polymer supports prepared by concentrated emulsion polymerization and their activity in the hydrolysis of triacylglycerides. *Biotechnology and Bioengineering* 42(7): 821-828.

207. Rutz D, Janssen R. 2008. Biofuel technology handbook. 2nd. Version, WIP Renewable Energies, Munchen, Germany
208. Saint James C. 2009. La Argentina y los biocombustibles de segunda y tercera generación. Cámara Argentina de Energías Renovables. Pág 3.
209. Salis A, Pinna M, Monduzzi M y Solinas V. 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*. 119(3): 291-299.
210. Samad MYA, Nyonya C, Razak A, Salleh AB 1, Zin Wan Yunus WM, Ampon K y Basri M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity . *Journal of Microbiological Methods* (9): 51- 56
211. Savitha, J, Srividya S, Jagat R, Payal P, Priyanki S, Rashmi GW, Roshini KT y Shantala Y. 2007. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *African Journal of Biotechnology*. 6(5): 564-568.
212. Schmidt-Dannert, C. 1999. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorganic and medical chemistry*. 7(10): 2123-2130. DOI: 10.1016/S0968-0896(99)00141-8
213. Schuchardt ULF, Sercheli R y Vargas RM. 1998. Transesterification of vegetable Oils: A review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 9(1): 199-210. DOI: 10.1590/S0103- 505 311998000300002
214. Sierra G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 23(1): 15–22.

215. Silva JA, Macedo GP, Rodrigues DS, Giordano RLC y Goncalves, LRB. 2012. Immobilization of *Candida Antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosanbased hydrogels using different support activation strategies. Biochemical Engineering Journal 60: 16–24. doi:10.1016/j.bej.2011.09.011
216. Shafei MS y Allam RF. 2010. Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum*. Malaysian Journal of Microbiology. 6(2): 196-202.
217. Secretaría de energía. 2005. Prospectiva de petrolíferos 2005-2014.
218. Senado de la República Gaceta Parlamentaria: Dictámenes aprobados en la LX legislatura relativos a leyes o decretos. 2008. Decreto que expide la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos.
219. Serralheiro M.L, Empis JM y Carbal JMS. 1990. Peptide synthesis by microencapsulated chymotrypsin. Annals of the New York Academy of Sciences 613(1): 638-642. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb18236.x
220. Shimada Y, Watanabe H, Samukawa T. 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. Journal of American Oil Chemist's Society. 76(7): 789-793.
221. Shimada Y, Watanabe H, Sugihara A y Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17(3-5): 133- 142. doi:10.1016/S1381-1177(02)00020-6
222. Sims R., Taylor M., Saddler J y Mabee W. 2008. From 1° to 2° generation biofuel technologies. An overview of current industry and RD&D activities. OECD/IEA. Pág.2.

223. Singh A, He B, Thompson J y Van Gerpen J. 2006. Process optimization of biodiesel production using different alkaline catalysts. *Applied Engineering in Agriculture*. 22(4): 597-600. (a)
224. Singh AK y Fernando SD. 2006. Catalyzed fast- transesterification of soybean oil using ultrasonication. American Society of Agricultural Engineers, ASAE Annual Meeting, Portland, Oregon, USA, July 9-July 12, Paper number 066220. (b)
225. Smaniotto A, Skovronski A, Rigo E, et al. 2012. “Synthetic lipase” production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43(4):1490-1498. doi:10.1590/S1517-838220120004000033.
226. Soumanou MM y Bornscheuer UT. 2003. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105(11): 656–660. doi: 10.1002/ejlt.200300871
227. Srivastava A y Prasad R. 2000. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 4:111–133.
228. Soumanou MM y Bornscheuer UT. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(1): 97-103. DOI: 10.1016/S014 1-0229(03)00090-5.
229. Statistics Canada. Canada’s Population Clock. Statistics Canada, Demography Division, 2006. Updated in 27 October 2006
230. Stratta J. 2000. Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel. *Investigación y Desarrollo – Departamento de Capacitación y Desarrollo de Mercado*

231. Stoytcheva M., Montero G, Toscano L, Gochev V y Valdez B. The Immobilized Lipases in Biodiesel Production. Biodiesel – Feedstocks and Processing Technologies. [Online]. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/23009.pdf>
232. Sudhir CV, Sharma NY y Mohanan P. 2007. Potential of waste cooking oil as biodiesel feedstock. Emirates Journal for Engineering Research. 12(13): 69-75.
233. Sundari SK y Adholeya A. 2000. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates: part II. Enzymes acting upon carbon compounds. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 865-868.
234. Szmigielski M, Maniak B y Piekarski W. 2008. Evaluation of chosen quality parameters of used fryngrape oil as fuel biocomponent. International Agrophysics. 22(4): 361-364.
235. Tamalampudi S, Talukder RM, Hamad S, Numatab T y Kondo A. et al. 2008. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. Biochemical Engineering Journal 39(1): 185-189. DOI: 10.1016/j.bej.2007.09.002
236. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A y Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution. 30(12): 2725-2729.
237. Talebian-Kiakalaieh A, Amin NAS y Mazaheri H. 2013. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. Appl Energ 104:683-710. doi:10.1016/j.apenergy.2012.11.061
238. Teng, Y y Xu Y. 2007. A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. Analytical Biochemistry. 363(2): 297-299. doi:10.1016/j.ab.2007.01.026

239. Treichel H, Oliveira B, Mazutti AM, Di Luccio M. y Olivira VJ. 2010. A review on microbial lipases production. Food Bioprocess Technology. 3. Págs. 182-196.
240. Tomasevic AV, Siler-Marinkovic SS. 2003. Methanolysis of used frying oil. Fuel Processing Technology. 81(1): 1-6.
241. Ul- Haq I, Idrees S y Rajoka MI. 2002. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. Process Biochemistry. 37: 637-641.
242. Van Der Walle N. 1927. Über synthetische Wirkung bakterieller Lipasen. Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr, 70: 369-373.
243. Van Gerpen J. 2005. Biodiesel processing and production. Fuel Processing Technology. 86(10): 1097-1107. DOI: 10.1016/j.fuproc.2004.11.005
244. Van Gerpen J. 2014. Animal Fats for Biodiesel Production. [Online] Consultado el 02/11/2015. Disponible en: <http://articles.extension.org/pages/30256/animal-fats-for-biodiesel-production>
245. Vicente LC, Barros RA y Empis JMA. 1994. Stability and proteolytic activity of papain in reverse micellar and aqueous media: A kinetic and spectroscopic study. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 60(3): 291-297. DOI: 10.1002/jetb.2806003 10.
246. Wang H, Zhong S, Ma H, Zhang J, y Qi Q. 2012. Screening and characterization of a novel alkaline lipase from *Acinetobacter calcoaceticus* 1-7 isolated from Bohai Bay in China for detergent formulation. Brazilian Journal of Microbiology. 43(1): 148-156.

247. Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A y Tominaga Y. 2001. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor Journal of the American Oil Chemists' Society. 78(7): 703-707.
248. Watanabe Y, Pinsirodom P, Nagao T, Yamauchi A, Kobayashi T, Nishida Y, Takagi Y y Shimada Y. 2006. Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antárctica*. lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 44(3-4):99–105. doi:10.1016/j.molcatb.2006.09.007
249. Willerding AL, De Oliveira LA, Wesen Moreira F, Gomes Germano M y Freitas Chagas Jr. A. 2011. Lipase Activity among Bacteria Isolated from Amazonian Soils. Enzyme Research. 2011. doi:10.4061/2011/720194
250. Wu X, Jaaskelainen S y Linko Y. 1996. An investigation of crude lipase for hydrolysis, esterification and transesterification. Enzyme and Microbial Technology. 19(3): 226:231. doi:10.1016/0141-0229(95)00239-1
251. Xia J, Huang B, Nie ZY, Wang W. 2011. Production and characterization of alkaline extracellular lipase from newly isolated strain *Aspergillus awamori* HB-03. Journal of Central South University of Technology 18(5): 1425–1433 DOI: 10.1007/s11771-011-0857-5.
252. Xu Y, Du W, Liu D y Zeng J. 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. Biotechnology Letters. 25(15): 1239-1241. DOI: 10.1023/A: 1025065209983
253. Yamaguchi S y Mase T. 1991. Appl Microbial Biotechnol 34:720

254. Yamane T. 1987. Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 64(12):1657–1662.
255. Yan X, Hongxiang X y Dong W. 1999. Fermentation conditions of lipase production by *Rhizopus* Y-92. *Indian Microbiol. China*, 29: 6-10.
256. Yong YP y Al-Duri BP. 1996. Kinetic studies on immobilized lipase esterification of oleic acid and octanol. . *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 65(3): 239-248. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(199603)65:3
257. Zhang Y, Dubé MA, McLean DD y Kates M. 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresource Technology*. 90(3): 229-240.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Eugenia Guadalupe Ortiz Lechuga

Candidato para el Grado de

Doctor con Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: CATALIZADORES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITES VEGETALES RESIDUALES

Campo de estudio: Biotecnología Ambiental

Datos personales: Nació en Sabinas, Coahuila el 25 de Marzo de 1987, hija del Sr. Roberto Ortiz Cobos y la Sra. Ma. Virginia Lechuga Castillo.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas, generación 2005-2009, grado obtenido: Biólogo, con mención honorífica y promedio de 92.8.

Experiencia laboral: Realización de tesis de licenciatura en el Departamento de Botánica FCB-UANL de Enero 2010-Febrero 2011. Realización de Tesis de Doctorado en el Instituto de Biotecnología FCB-UANL Enero 2011-Febrero 2016. Investigador No Docente en Instituto de Biotecnología desde Marzo 2015.